

Actinobacillus pleuropneumoniae DNA-Nachweis in oral fluid
samples von Schweinen aus konventionellen Mastbeständen

von Michael Kleinmans

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Actinobacillus pleuropneumoniae DNA-Nachweis in oral fluid
samples von Schweinen aus konventionellen Mastbeständen

von Michael Kleinmans
aus Kamp-Lintfort

München 2021

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. M. Ritzmann

Mitbetreuung durch: Priv.-Doz. Dr. M. Eddicks

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Joachim C. Manning

Tag der Promotion: 06.02.2021

Meiner Familie und meiner Freundin Sophia

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	3
1.1.	Allgemeine Grundlagen.....	3
1.2.	Serotypen	3
1.3.	Klinisches Bild und Krankheitsverlauf.....	4
1.4.	Pathologische Veränderungen	5
1.5.	Virulenzfaktoren und Pathogenese.....	6
1.6.	Epidemiologie.....	9
1.7.	Immunologie und Impfungen.....	11
1.8.	Diagnostik von <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	14
1.8.1.	Kulturelle Anzucht.....	14
1.8.2.	Serologie	15
1.8.3.	Polymerase Chain Reaktion.....	19
1.8.4.	Lungenbeurteilung am Schlachthof.....	21
2.	Oral fluid samples.....	23
2.1.	Einsatz von oral fluid samples.....	23
2.2.	Monitoring mit Hilfe von oral fluid samples.....	25
III.	MATERIAL UND METHODEN	27
1.	Zielsetzung.....	27
2.	Versuchsbetriebe	27
2.1.	Einschlusskriterium	27
2.2.	Nachweise aus der Routinediagnostik.....	27
2.3.	Betriebsabläufe	27
3.	Versuchsablauf	28
3.1.	Einstellung und Vorbereitungen.....	28
3.2.	Probenentnahmen.....	29
3.2.1.	Oral fluid samples.....	29
3.2.1.1.	Gewinnung von oral fluid samples	29
3.2.1.2.	Entnahmezeitpunkte.....	29
3.2.2.	Stichblutproben.....	31
3.3.	Lungenbeurteilung.....	32

3.3.1.	Pleuritiden	32
3.3.2.	Enzootische Pneumonie-ähnliche Läsionen	32
4.	Probenanalyse	33
4.1.	Molekularbiologische Untersuchung	33
4.2.	Serologische Untersuchung	33
5.	Mastdauer.....	34
6.	Statistik.....	34
6.1.	Deskriptive Statistik	34
6.2.	Statistische Analyse.....	34
IV.	ERGEBNISSE	37
1.	Oral fluid samples	37
1.1.	Apx-DNA in oral fluid samples auf Bestandsebene	37
1.2.	Apx-DNA in oral fluid samples im zeitlichen Verlauf auf Bestandsebene.....	38
1.3.	Apx-DNA in oral fluid samples als Einzelproben	41
1.4.	Apx-DNA in oral fluid samples aller untersuchten Buchten.....	41
1.5.	Apx-DNA in oral fluid samples verschiedener Buchten über im Zeitverlauf.....	41
2.	Nachweis spezifischer Antikörper gegen Apx IV-I und OMP in Stichblutproben	48
2.1.	Nachweis spezifischer Antikörper auf Bestandsebene.....	48
2.2.	Nachweis spezifischer Antikörper in verschiedenen Buchten.....	49
3.	Ergebnisse Lungenbeurteilung.....	53
3.1.	Lungenbeurteilung nach dem Schlachthof Evaluations System.....	53
3.2.	Lungenbeurteilung nach dem Madec Score.....	55
4.	Mastdauer.....	57
5.	Übereinstimmung der verschiedenen verwendeten Methoden der APP-Diagnostik.....	58
6.	Statistische Auswertung	59
6.1.	Zusammenhang zwischen Apx-DNA in oral fluid samples und dem Ergebnis des Schlachthof Pleuritis Evaluations System	59
6.2.	Zusammenhang zwischen der in oral fluid samples nachgewiesenen Apx-	

	DNA und Länge der Mastdauer	59
6.2.1.	Zusammenhang zwischen der gemessenen Apx-DNA-Menge in oral fluid samples und der Länge der Mastdauer	59
6.2.2.	Assoziationen zwischen dem Nachweis von Apx-DNA in oral fluid samples aus positiven Buchten und der Länge der Mastdauer	60
6.3.	Zusammenhang zwischen den Lungenscores und der Mastdauer	61
V.	DISKUSSION	63
1.	Apx IV DNA-Nachweis in oral fluid samples	63
2.	Apx III und I DNA-Nachweis in oral fluid samples	68
3.	Nachweis spezifischer Antikörper in Stichblutproben	72
4.	Mastdauer	77
5.	Monitoringprogramm	81
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	85
VII.	SUMMARY	87
VIII.	TABELLENVERZEICHNIS	89
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	91
X.	LITERATURVERZEICHNIS	95
XI.	ANHANG	125
1.	Nachweise aus der Routinediagnostik	125
1.1.	Betrieb A	125
1.2.	Betrieb B	126
2.	BioChek APP qPCR Test	128
3.	Datapack <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> DNA Test Kit	133
XII.	DANKSAGUNG	143

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
A.	<i>Actinobacillus</i>
AG	Antigen
APP	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Apx	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> RTX-Toxin
BALF	bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
c	Kopien
CPS	Kapselpolysaccharide
DIVA	Differenzierung zwischen infizierten und vakzinierten Tieren
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EP	Enzootische Pneumonie
exkl.	exklusiv
g	Gramm
IAV	Influenza A Virus
Ig	Immunglobuline
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-I	Interleukin I
KbE	Koloniebildende Einheit
KBR	Komplementbindungsreaktion
kDA	Kilodalton
LC-LPS	Langkettige Lipopolysaccharide
Log	Logarithmus
LPS	Lipopolyssaccharide
M.	<i>Mycoplasma</i>
Max.	Maximum
Mat. AK	Maternale Antikörper
Min.	Minimum
mPCR	Multiplex PCR
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
OF	oral fluids
OFS	oral fluid samples
omIA	outer membrane lipoprotein A
OMP	Outer membrane proteins
PCR	Polymerase Chain Reaktion

PCV ₂	Porzines Circovirus Typ 2
p. inf.	<i>post infectionem</i>
PMN	polymorphkernige Leukozyten
PRDC	porcine respiratory disease complex
PRRS-Virus	Porzines reproduktives and respiratorisches Syndrom-Virus
qPCR	Quantitative real-time PCR
RTX	repeats in toxin
S/P Ratio %	Probenergebnis zu Positivkontrollergebnis in Prozent
SD	Standardabweichung
SPES	Schlachthof Pleuritis Evaluations System
SPF	spezifisch pathogenfrei
ST	Serotyp
TbP ₂	Transferrin bindendes Protein 2
TNF-alpha	Tumor Nekrose Faktor alpha
vgl.	vergleiche

I. EINLEITUNG

Das Bakterium *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) infiziert die Atemwege von Schweinen (POHL et al., 1983). Diese Atemwegsinfektionen können perakute Todesfälle oder akute und chronische Pleuropneumonien zur Folge haben (SHOPE, 1964; GOTTSCHALK, 2019). Die Krankheitsbilder führen in der Schweinehaltung zu hohen gesundheitlichen und ökonomischen Einbußen (PAGOT et al., 2007). Subklinisch infizierte Tiere sind die Haupteintragsquelle von APP in immunologisch naive Herden (DUBREUIL et al., 2000). Die frühzeitige und präzise Diagnose von infizierten Tieren ist der entscheidende Faktor, um APP-Infektionen kontrollieren zu können (DUBREUIL et al., 2000; GOTTSCHALK, 2015). Untersuchungsmaterialien, die sich für die APP-Diagnostik am lebenden Tier eignen sind Blutproben, Tonsillenkratzproben, Nasentupfer und die bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit (BALF) (VAN LEENGOED & KAMP, 1989; CHIERS et al., 2001; COSTA et al., 2011; FABLET et al., 2012). Es ist bereits in ersten Versuchen gelungen, APP Desoxyribonukleinsäure (DNA) in oral fluid samples (OFS) nachzuweisen (COSTA et al., 2012; DRON et al., 2012; CHEONG et al., 2017). Vorteile einer Beprobung von Tiergruppen unter Verwendung von OFS gegenüber den herkömmlichen Untersuchungsmaterialien sind die einfache und schnelle, tierfreundliche und nicht invasive Anwendungsmöglichkeit sowie die Möglichkeit zur Umsetzung großer Stichprobenumfänge (25 Tiere pro OFS) (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010; FABLET et al., 2017; BJUSTROM-KRAFT et al., 2018). Der Gebrauch von OFS wird im Gegensatz zur APP-Diagnostik für andere relevante Erreger in der Schweinehaltung bereits routinemäßig verwendet. In der Schweinebranche gibt es eine weitgehende Akzeptanz für den Einsatz von OFS zu diagnostischen Zwecken (BJUSTROM-KRAFT et al., 2018).

Um den Gebrauch von OFS für die APP-Diagnostik weiter zu etablieren, wird in der vorliegenden Arbeit der APP-Nachweis mit Hilfe von OFS unter Feldbedingungen analysiert. Es werden hierfür folgende Hypothesen überprüft:

- 1) In Mastbeständen mit APP infizierten Tieren ist Apx-DNA in OFS nachweisbar.

- 2) Der Nachweis von Apx IV DNA sowie Apx III und I DNA ist in OFS möglich.
- 3) Eine engmaschige Beprobung der Mastschweine mittels OFS ist für einen Apx-DNA-Nachweis vorteilhafter als eine einmalige oder weitmaschige Beprobung.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

1.1. Allgemeine Grundlagen

APP ist ein gram negatives, fakultativ anaerobes, unbewegliches und nicht sporenbildendes Stäbchenbakterium (POHL et al., 1983). Taxonomisch gehört die Spezies APP der Gattung der *Actinobacillus*, der Familie der *Pasteurellaceae* und der Ordnung der *Pasteurellales* an (POHL et al., 1983; BUSSE et al., 1997; NAUSHAD & GUPTA, 2012). Diese Ordnung ist in die Klasse der *Gamma proteobakteria* und den Stamm der *Proteobacteria* einzuordnen (GUPTA, 2000; GAO et al., 2009). APP wird 1957 erstmalig isoliert und beschrieben (PATTISON et al., 1957). Es wird zwischen zwei Biotypen unterschieden: Biotyp 1 umfasst die V-Faktor/Nikotinamidadenindinukleotid (NAD)-abhängigen Stämme, die zuvor als *Haemophilus pleuropneumoniae* bezeichnet wurden (MATTHEWS & PATTISON, 1961). Der Biotyp 2 umfasst V-Faktor/NAD-unabhängige Stämme und wird durch den Stamm Bertschinger 2008/76 repräsentiert (POHL et al., 1983).

1.2. Serotypen

Die Einteilung in verschiedene Serotypen (ST) erfolgt sowohl über die Lipopolysaccharide (LPS) als auch über die Kapselpolysaccharide (CPS) der Bakterienzellwand (PERRY et al., 1990). Biotyp 1 (NAD-abhängig) umfasst die ST 1 bis 12 und 15 bis 18 (PERRY et al., 1990; BLACKALL et al., 2002; PERRY et al., 2005; SÁRKÖZI et al., 2015; BOSSÉ et al., 2018b). Dem Biotyp 2 (NAD-unabhängig) werden die zwei ST 13 und 14 zugerechnet (NIELSEN et al., 1997). Des Weiteren gibt es ST, die sowohl Biotyp 1 als auch Biotyp 2-Stämme aufweisen, dazu zählen die ST 2, 4, 7, 9, 11 und 17 (BECK et al., 1994; MALDONADO et al., 2009; MALDONADO et al., 2011; BOSSÉ et al., 2018b).

Von den typischen Serotypmustern weichen einzelne ST ab (NIELSEN et al., 1996; GOTTSCHALK et al., 2000). In Nordamerika gibt es beispielsweise einen atypischen ST 13, welcher im Gegensatz zu dem europäischen ST 13 dem Biotyp 1 zugehört. Weiterhin stellen sich die CPS typisch nach dem Muster des ST 13 dar, die LPS hingegen ähneln denen des ST 10 (PERRY et al., 2012). Um eine verlässliche Serotypisierung zu erreichen sollte daher sowohl das CPS- als

auch LPS-Muster bestimmt werden (RODRÍGUEZ-BARBOSA et al., 1996).

Bei einigen ST ist der Aufbau des LPS identisch beziehungsweise unterscheidet sich nur um wenige Zuckermoleküle, sodass es zu Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen ST kommt und die ST nicht eindeutig differenziert werden können. Betroffene Gruppen von ST sind jeweils 1/9/11, 4/7 und 3/6/8 (PERRY et al., 1990; MALDONADO et al., 2009; MALDONADO et al., 2011). Weitere Kreuzreaktionen sind zwischen den ST 2/4, 3/8/15 und 8/17 beschrieben (PERRY et al., 2005; MALDONADO et al., 2011; BOSSÉ et al., 2018b). Aufgrund von Kreuz- oder fehlenden Reaktionen gibt es immer wieder nicht eindeutig zuordenbare ST (MALDONADO et al., 2011).

1.3. Klinisches Bild und Krankheitsverlauf

APP-Infektionen lassen sich in perakute, akute, chronische und subklinische Verlaufsformen einteilen (REINER, 2015). Die am meisten verbreitete Verlaufsform ist nach GROßE BEILAGE et al. (2013) die subklinische Form. Ausprägungsgrad und Manifestation hängen von prädisponierenden Faktoren und der Virulenz des ST ab (ROSENDAL & MITCHELL, 1983; ROSENDAL et al., 1985). Es können Tiere jeden Alters betroffen sein, allerdings erkranken vor allem Schweine in der Mittel- bis Endmast (GROßE BEILAGE et al., 2013).

Die perakute Verlaufsform ist durch plötzlich verendende Tiere gekennzeichnet, dabei kann es einzelne oder auch mehrere Tiere in einem Abteil betreffen. Oft werden tote Schweine vorgefunden, ohne dass zuvor Anzeichen einer respiratorischen Erkrankung sichtbar waren (SHOPE, 1964). Eine Kreislaufinsuffizienz und weniger die respiratorische Insuffizienz stehen bei den betroffenen Tieren im Vordergrund (GROßE BEILAGE et al., 2013). Neben extrem hohem Fieber (bis zu 42,0°C) (SHOPE, 1964) werden die Schweine durch Apathie und Anorexie, gefolgt von einer kurzen Phase mit Vomit, auffällig (LIGGETT et al., 1987). Es folgt eine Tachykardie und das kardiovaskuläre System beginnt zu versagen. Ausgeprägte Zyanosen werden am gesamten Körper sichtbar. Schließlich kommt es zu Dyspnoe mit Maulatmung, die Schweine nehmen eine hundesitzige Stellung ein und die Körperkerntemperatur beginnt zu fallen. Kurz vor dem Exitus tritt ein blutig-schaumiger Ausfluss aus Nase und Mund (ROSENDAL et al., 1985; GOTTSCHALK, 2019).

Bei der akuten Verlaufsform sind deutliche Anzeichen einer Atemwegsinfektion

wie trockener Husten, hochfrequente abdominale Atmung und gelegentlich auch Maulatmung sichtbar. Dies ist kombiniert mit hohem Fieber von bis zu 41,0°C und Inappetenz (LIU et al., 2009; GOTTSCHALK, 2019). Die Ausprägung der klinischen Anzeichen ist abhängig von dem Grad der Lungenläsionen. Maßgeblichen Einfluss auf den weiteren Erkrankungsverlauf betroffener Tiere hat eine frühzeitige Einleitung einer Behandlung (GOTTSCHALK, 2019). Überlebende Tiere weisen häufig eine verminderte Mastleistung auf (HOLMGREN et al., 1999).

Schweine, die an der chronischen Verlaufsform der APP erkrankt sind, haben kein oder nur geringgradiges Fieber. Des Weiteren husten chronisch an APP erkrankte Schweine spontan oder intermittierend, wobei die Intensität variiert (MYLREA et al., 1974; GOTTSCHALK, 2019).

1.4. Pathologische Veränderungen

Die makroskopischen Veränderungen unterscheiden sich gemäß dem klinischen Verlauf. Bei der äußeren Betrachtung von perakut und akut an APP verendeten Schweinen fällt bereits ein blutig-schaumiger Nasen-Ausfluss auf, welcher auch in der Trachea und in den Bronchien vorzufinden ist. Bei der Eröffnung der Brusthöhle zeigt sich eine blutfarbige Flüssigkeitsansammlung (SHOPE, 1964). Die Pneumonien können sowohl uni- als auch bilateral auftreten (SHOPE, 1964). Betroffene Lungenareale sind vor allem die dorsalen Hauptlappen (GRUBER & HEWICKER-TRAUTWEIN, 2015).

Bei der perakut verlaufenden Form der APP verenden die Tiere innerhalb von 24 Stunden *post infectionem* (p. inf.). Die betroffenen Lungenlappen sind gestaut, ödematös und weisen durch blutfarbene, gelatinöse Flüssigkeit geweitete interlobuläre Septen auf. Die Oberflächen der Lungenlappen sind glänzend und zeigen noch keine Anzeichen einer Pleuritis (SHOPE, 1964).

Bei der akuten Verlaufsform der APP (über 24 Stunden p. inf.) weisen die veränderten Lungenbereiche lockere fibrinöse Auflagerungen auf und teilweise sind Areale von gelblichem Exsudat überzogen (SHOPE, 1964). Die betroffenen Lungenbereiche stellen sich als purpurrote Areale mit derber, teils brüchiger, leberartiger Konsistenz dar. Die Anschnittsfläche der Pneumonieherde präsentiert sich als diffuse Haemorrhagie mit nekrotischen Bereichen, durchsetzt von helleren, weißlichen, fibrinhaltigen Strängen. Die interlobulären Septen sind durch blutig-gelatinöse Flüssigkeit erweitert (SHOPE, 1964;

GOTTSCHALK, 2019).

Nach überstandener akuter Verlaufsform stellen sich die chronischen APP-Infektionen typischerweise als multiple, derbe, rundlich organisierte Areale dar, die aus entzündetem und nekrotischem Lungengewebe bestehen und die sich als Sequester abkapseln. Der Durchmesser beträgt bis zu 4 cm. Die Pleura über diesen Arealen bildet eine feste, fibröse Adhäsion zur Brustwand (SHOPE, 1964). Bei milden Verläufen der APP kann sich das Lungenparenchym regenerieren und es bleiben lediglich Verwachsungen der Pleura bestehen. Auf Grund dieser festen Verbindung verbleibt, wenn das Geschlinge beim Schlachten ausgelöst wird, bei Tieren mit einer chronischen Pleuritis Lungengewebe im Tierkörper (GOTTSCHALK, 2019). Die pathologisch-morphologischen Veränderungen einer akuten APP-Infektion sind fibrinös-eitrige oder hämorrhagisch-nekrotisierende Pleuropneumonien (GRUBER & HEWICKER-TRAUTWEIN, 2015).

1.5. Virulenzfaktoren und Pathogenese

Actinobacillus pleuropneumoniae gelangt in der Regel durch die Inhalation von Aerosolen in das Tier (VAN OVERBEKE et al., 2002; CHIERS et al., 2010). Häufig bindet das Bakterium dann an die Epithelien der Tonsillen und verweilt in den tiefen Krypten (SIDIBE et al., 1993; CHIERS et al., 1999; VELTHUIS et al., 2002; VIGRE et al., 2002). Von besonderem Interesse ist jedoch der untere Respirationstrakt. Hier löst APP Gewebeschädigungen aus und in deren Folge kommt es zu klinischen Anzeichen bis hin zum Tod (CHIERS et al., 2010). Die Wirtsabwehr ist für den Verlauf einer APP-Infektion von zentraler Bedeutung (BOSSÉ et al., 2002). Zu den Komponenten des respiratorischen Immunsystems zählen unter anderem Hustenreflexe, mukoziliäre Clearance, das Komplementsystem und phagozytierende Zellen (BOSSÉ et al., 2002; CHIERS et al., 2010). Durch eine Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance kommt es zu einer deutlich erhöhten Anfälligkeit für eine APP-Erkrankung (NARITA et al., 1995).

Die meisten pathologischen Veränderungen einer Pleuropneumonie lassen sich auf von APP produzierte Toxine zurückführen. Diese Toxine haben zum einen direkte zytotoxische Effekte auf die verschiedensten Zelltypen. Zum anderen kommt es durch diese Toxine zu einer indirekten Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren aus aktivierten Phagozyten (BOSSÉ et al., 2002).

KAMP et al. (1991) beschreiben drei extrazelluläre haemolytische und zytotoxische Proteine aus der porenbildenden RTX-Familie (repeats in toxin). Diese Proteine werden zunächst als Zytolysin I–III bezeichnet. Später wird die Bezeichnung Apx als Abkürzung für *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-Toxin eingeführt (FREY et al., 1993). Diese Exotoxine besitzen vier essentielle Proteine mit jeweils spezifischen Aufgaben. Hierbei kodiert das Gen *apxA* ein strukturelles Proteintoxin und das Gen *apxC* ein Aktivatorprotein, welches essentiell bei der Umwandlung des Apx-Protoxins in das aktive Toxin ist. Die Gene *apxB* und *apxD* kodieren membranassoziierte Proteine für die Sekretion des Apx (FREY et al., 1993; BECK et al., 1994).

Apx I ist ein 105 Kilodalton (kDA) schweres, hoch virulentes RTX-Toxin, welches stark haemolytische und zytotoxische Eigenschaften besitzt. Es wird von den ST 1, 5a und b, 9, 10, 11, 14 und 16 sezerniert. Die Gene *apxICABD* kodieren das Apx I (KAMP et al., 1991; FREY et al., 1993; BECK et al., 1994; FREY, 1995; FREY, 2003; SÁRKÖZI et al., 2015).

Das moderat virulente Apx II weist ein schwach haemolytisches und mäßig zytotoxisches Potential auf. Es wird von den ST 1 bis 18, exklusiv 10 und 14, exprimiert. Apx II hat eine molekulare Masse von 103 kDA und besitzt die Gene *apxIICA* (KAMP et al., 1991; FREY et al., 1993; BECK et al., 1994; FREY, 1995; BLACKALL et al., 2002; FREY, 2003; SÁRKÖZI et al., 2015; BOSSÉ et al., 2018b). Für den Sekretionsweg von Apx II sind die Gene *apxIBD* verantwortlich. Bei dem ST 3, der ausschließlich über Gene der Art *apxIICA* verfügt, ist die Apx II Sekretion nicht möglich (FREY, 2003).

Das 120 kDA schwere Apx III verfügt nicht über haemolytische, dafür jedoch über starke zytotoxische Eigenschaften. Die ST 2, 3, 4, 6, 8 und 15 produzieren das Toxin, welches durch die Gene *apxIIICABD* kodiert wird (KAMP et al., 1991; FREY et al., 1993; BECK et al., 1994; BLACKALL et al., 2002; FREY, 2003).

Anhand eines mutierten ST 1 werden synergistische Effekte von Apx I und Apx II nachgewiesen (BECK et al., 1994; TASCÓN et al., 1994). Neben den Toxinen Apx I–III stellt die Anwesenheit von Apx IVA einen zusätzlichen, essentiellen Faktor zur Erlangung der maximalen Virulenz dar (LIU et al., 2009).

Apx IVA ist ein 202 kDA schweres RTX-Toxin, welches von dem Gen *apxIVA*

kodiert wird (SCHALLER et al., 1999; CHO & CHAE, 2001). Alle APP ST sezernieren ausschließlich in vivo Apx IVA (SCHALLER et al., 1999; BLACKALL et al., 2002; FREY, 2003; DREYFUS et al., 2004; SÁRKÖZI et al., 2015; BOSSÉ et al., 2018b). Von dem ST 5b wird das Toxin nur in geringen Mengen produziert (DREYFUS et al., 2004). Apx IVA ist speziesspezifisch für APP, denn es wird von keinem anderen bekannten Bakterium gebildet (SCHALLER et al., 1999; DREYFUS et al., 2004). Rekombinantes Apx IVA zeigt eine schwache haemolytische Aktivität sowie einen co-haemolytischen Effekt, allerdings nur bei gleichzeitiger Anwesenheit der aktivierenden Genregion ORF1 (SCHALLER et al., 1999).

Die Apx-Toxine sind entscheidend für die Pathogenität (TASCÓN et al., 1994). Bei hohen Apx-Konzentrationen wirken diese zytotoxisch auf Makrophagen, polymorphkernige Leukozyten (PMN) und weitere Zielzellen. In den Zellmembranen entwickeln sich Poren, die osmotische Schwellungen zur Folge haben und letztlich im Zelltod enden (SEREBRIN et al., 1991; WELCH, 1991; VAN DE KERKHOF et al., 1996). Das Ausmaß der Zytolyse hängt von der Porenbildungsaktivität ab. Diese unterscheidet sich bei den einzelnen Apx-Toxinen deutlich und setzt sich aus der Kanalbildungskapazität und der Leitfähigkeit zusammen. Das Exotoxin Apx I besitzt die größte Porenbildungsaktivität, gefolgt von Apx III und Apx II (MAIER et al., 1996). CHIEN et al. (2009) zeigen den zeitlichen und konzentrationsbedingten Einfluss von Apx I auf Alveolarmakrophagen, resultierend in den typischen morphologischen Veränderungen einer Apoptose. Bei niedrigen sublytischen Apx-Toxinkonzentrationen entstehen irreversible Schwellungen der Zellen, wodurch es zu Beeinträchtigungen der chemotaktischen und phagozytotischen Aufgaben der Abwehrzellen kommt (WELCH, 1991). Sowohl die Schädigung der Endothelzellen durch Apx als auch die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren durch LPS lösen die Gerinnungskaskade, die Fibrinolyse und das Kinin-System aus. Die losgelöste Gerinnungskaskade mündet in der Bildung von Mikrothromben und hat lokale Ischämien und Nekrosen zur Folge. Dies spiegelt sich vor allem im charakteristischen Bild der akuten APP wieder (BERTRAM, 1988; SEREBRIN et al., 1991; BOSSÉ et al., 2002).

Die perakuten letalen Verlaufsformen stehen im Zusammenhang mit einer massiven Freisetzung von LPS, die zu einem Endotoxinschock führt (GOTTSCHALK, 2019).

1.6. Epidemiologie

Die APP-Ausscheidung erfolgt als Exkretion via Nasopharynx. Die Hauptübertragungsrouten sind ein direkter nasaler Kontakt und die Aerosolinhalation. Von untergeordneter Bedeutung ist hingegen die indirekte Transmission mittels Trägerstoffen (VELTHUIS et al., 2003; KRISTENSEN et al., 2004b; ASSAVACHEEP & RYCROFT, 2013).

Experimentell wird eine Korrelation zwischen inhaliertem Erregermenge, Inkubationszeit und Mortalitätsrate nachgewiesen (SEBUNYA et al., 1983). Des Weiteren gibt es einen Zusammenhang zwischen den klinischen Bildern, bakterieller Menge in dem Oropharynx sowie in der Nasenhöhle und der Transmissionsrate. Allerdings haben Tiere mit hochgradiger klinischer Ausprägung der Erkrankung eine verminderte Ansteckungsrate, da sie zu ihren Artgenossen in geringerem Umfang Kontakt aufnehmen (TOBIAS et al., 2013).

Eine vertikale Infektion durch den engen Kontakt zwischen Sau und Ferkeln ist während der Säugeperiode möglich (VIGRE et al., 2002). Trotz maternalen Antikörper kommt es zu einer Kolonisierung des oberen Respirationstraktes (CHIERIS et al., 2002b). Die früheste Ferkelinfection ist bereits am elften Lebensstag nachgewiesen (VIGRE et al., 2002). Zu der Kolonisierung der Lunge und zu klinischen Anzeichen kommt es indes nicht vor der zwölften Lebenswoche (CHIERIS et al., 2002b; VIGRE et al., 2002).

Horizontale Übertragungen haben einen Peak in dem Alter zwischen der sechsten bis zwölften Lebenswoche (VIGRE et al., 2002). Dies steht im direkten Zusammenhang mit dem Abfall der schützenden maternalen Antikörper in dem Alter zwischen der achten bis zwölften Lebenswoche (GARDNER et al., 1991; CHIERIS et al., 2002b; VIGRE et al., 2002). Zusätzlich scheiden die bereits infizierten Tiere vermehrt Erreger aus (VIGRE et al., 2002).

Innerhalb einer Bucht ist das Ansteckungsrisiko zwischen den Tieren zehnmal höher als zu Schweinen in anderen Buchten. Während eines klinischen Ausbruches ist dieses Risiko noch höher. Das Ansteckungsrisiko zu Tieren aus anderen bisher noch nicht infizierten Buchten zeigt keinen signifikanten Unterschied darin, ob es sich um eine direkt benachbarte oder eine weiter entfernt gelegene Bucht handelt (TOBIAS et al., 2014).

Die Haupteintragsquelle von APP in immunologisch naive Herden sind Carriertiere (ROSENDAL & MITCHELL, 1983). Es ist möglich, dass sich

Carriertiere für längere Zeit unauffällig im Bestand befinden (CHIERs et al., 2002b). Die durchschnittliche Kolonisationsdauer der Tonsillen beträgt sieben bis acht Wochen (VIGRE et al., 2002). APP-Krankheitsausbrüche von gesamten Tiergruppen entwickeln sich nicht durch eine akute, von einzelnen Tieren ausgehende Ansteckungswelle. Vielmehr war im Regelfall ein Großteil der Tiere bereits im Vorfeld infiziert und ein Trigger sorgt dafür, dass es zum Ausbruch der APP kommt (TOBIAS et al., 2013). Diese Trigger können infektiösen oder nichtinfektiösen Ursprungs sein (DUBREUIL et al., 2000; VAN DIXHOORN et al., 2016). Zu den nichtinfektiösen Risikofaktoren zählen Stress, Umwelteinflüsse, Platzmangel, negative klimatische Bedingungen, jahreszeitliche Einflüsse (vermehrte Prävalenz von Pleuritiden bei Tieren, die im Januar und Februar geschlachtet werden), die Mischung von Tiergruppen und Transportstress (ROSENDAL & MITCHELL, 1983; MAES et al., 2001; CHIERs et al., 2010; TOBIAS et al., 2014). Zu den infektiösen Einflüssen zählen Co-Infektionen mit anderen Atemwegserregern wie *Mycoplasma* (M.) *hyopneumoniae* (MAROIS et al., 2009) sowie der *Aujeszky'schen Krankheit* (NARITA et al., 1997). Infektionen mit APP in Kombination mit dem *Porzinen reproduktiven und respiratorischen Syndrom-Virus* (PRRSV) oder dem *Porzinen Circovirus Typ 2* (PCV 2) führen zu einer extensiveren Ausbildung von Pleuritiden (FABLET et al., 2012; NICKOLL, 2018). Co-Infektionen mit APP und Influenzaviren zeigen negative Einflüsse auf die Schweregrade der Pneumonien, welche durch die Influenza verursacht werden. Es gibt jedoch, andersherum betrachtet, keine wesentlichen Einflüsse von Influenza-Infektionen auf den Verlauf der APP-Infektion (POMORSKA-MÓL et al., 2017).

APP überlebt in der Umwelt nur für eine kurze Zeit, besonders empfindlich ist das Bakterium gegen Trockenheit und Wärme. Falls APP von Mukus ummantelt ist, kann es hingegen Tage bis Wochen in der Umwelt überleben (ASSAVACHEEP & RYCROFT, 2013).

Der Großteil der Schweineherden ist mit einem oder mehreren APP ST infiziert (CHIERs et al., 2002b; GROßE BEILAGE et al., 2013; RENKEN, 2017). Es lassen sich nicht immer alle APP ST nachweisen (CHIERs et al., 2002b). In Nordwestdeutschland kommen die APP ST 3/6/8, 4/7 und 12 bei Screenings nahezu ubiquitär vor (BAIER & BRACKMANN, 2018). Des Weiteren sind in Betrieben mit rezidivierender Atemwegsproblematik deutschlandweit die

ST 3/6/8 am weitesten verbreitet (RENKEN, 2017). ST mit einer niedrigen Virulenz besitzen in der Regel eine höhere Prävalenz als virulentere ST. Der Nachweis der ST von erkrankten Tieren stimmt daher häufig nicht mit den ST der höchsten Prävalenz in dem Bestand überein (GOTTSCALK, 2019). In einer Studie wird diskutiert, ob die Langzeitpersistenzen von APP ST in Schweineherden durch Biofilme, die von APP-Bakterien gebildet werden, bedingt sind (APER et al., 2020).

1.7. Immunologie und Impfungen

Eine lokale wie auch systemisch humorale Immunantwort gegen APP bilden Schweine durch natürliche Infektionen und Vakzinationen aus (BOSSÉ et al., 1992).

Neutralisierende Antikörper gegen Apx sind der entscheidende Schutzfaktor bei APP-Infektionen, da ein hoher Antikörper-Spiegel im Serum für eine geringe Mortalität und die verminderte Entwicklung von Pleuropneumonien sorgt (DEVENISH et al., 1990; CRUIJSEN et al., 1995). Weitere APP-Bestandteile, wie z.B. das Protein outer membrane lipoprotein A (omlA) und das 42 kDA maltose-abhängige outer membrane proteins (OMP) zeigen ebenfalls eine messbare humorale Immunantwort (GERLACH et al., 1993; BUNKA et al., 1995; TUMAMAO et al., 2004a). Antikörper gegen diese APP-Bestandteile sorgen zwar für eine Verringerung der Mortalität, jedoch nicht für einen effektiven Schutz gegen die Ausbildung von Lungenschädigungen. Das 14 kDA OMP der Pal Familie reagiert zwar mit der stärksten Immunantwort, besitzt jedoch auch inhibierende Eigenschaften gegen die Apx I und II Antikörper (VAN DEN BOSCH & FREY, 2003).

Abhängig von der Infektionsphase zeigen die Immunglobuline (Ig) im Serum verschiedene Verhaltensweisen. In der frühen Infektionsphase weisen die Immunglobuline M (IgM) einen raschen Anstieg auf, fallen jedoch auch schnell wieder ab. Der Immunglobulin G (IgG) Anstieg verläuft hingegen träge, dafür ist die Halbwertszeit wesentlich länger und stellt langfristig den dominierenden Anteil der Antikörper im Serum dar (BOSSÉ et al., 1992). Des Weiteren steigen in der nasalen Lavage und in der BALF vorrangig lokal produzierte Immunglobuline A (IgA) und IgG gegen die LPS, CPS und Apx nach Antigen (AG) Kontakt an. In der nasalen Lavage sind IgM gegen Apx-Toxine gar nicht und in der BALF nur im geringen Maße vorhanden (BOSSÉ et al., 1992;

LOFTAGER et al., 1993; KREJCI et al., 2005). Eine APP-Infektion, welche auf die Tonsillen beschränkt bleibt, muss keine Bildung von Antikörpern gegen Apx zur Folge haben (CHIERs et al., 2002b).

Über das Kolostrum erhalten Ferkel maternale Antikörper von der Sau, dabei spiegelt sich die Höhe des Antikörpertiters im Serum der Sauen sowohl im Kolostrum als auch später in den Ferkeln selbst wieder (VIGRE et al., 2003). IgG stellt hierbei den prädominierenden Anteil dar.

Maternale Antikörper sind auch in der BALF nachweisbar (KREJCI et al., 2005). Die Halbwertszeit maternaler Antikörper beträgt durchschnittlich zwei Wochen und die Abnahmedauer im Serum der Ferkel hängt von der aufgenommenen Gesamtmenge an maternalen Antikörpern ab (GARDNER et al., 1991; VIGRE et al., 2003). Als Nachweisgrenze wird der Zeitraum zwischen der zweiten Lebenswoche und dem zweiten Lebensmonat beschrieben (VIGRE et al., 2003; SJÖLUND et al., 2011). Im Serum ist um die zwölfte Lebenswoche die Gesamt-Antikörper-Konzentration am niedrigsten (CRUIJSEN et al., 1995; CHIERs et al., 2002b). Auf Grund der niedrigen Antikörpertiter ist dieser Zeitraum gleichzeitig auch der empfindlichste Phase für eine APP-Infektion (CRUIJSEN et al., 1995). Ferkel mit einem hohen Anfangsgehalt an maternalen Antikörpern gegen APP bilden im weiteren Verlauf ihres Lebens selber auch deutlich höhere Mengen an Antikörpern gegen APP, als Ferkel mit einem niedrigem Anfangsgehalt an maternalen Antikörpern gegen APP (SJÖLUND et al., 2011). Auch unter dem Schutz von maternalen Antikörpern gegen APP kommt es zu Infektionen des oberen Respirationstrakts (CHIERs et al., 2002b). In einer Quelle wird ein Anstieg von Antikörpern gegen das LPS von APP in Anwesenheit maternaler Antikörper beschrieben (KREJCI et al., 2005). Eine Kolonisation der Lunge ist jedoch erst in der zwölften Lebenswoche beschrieben, woraus die Autoren folgern, dass die neutralisierenden maternalen Antikörper vor einer Lungenkolonisation schützen (CHIERs et al., 2002b).

Eine Impfung gegen APP schützt nicht vor einer Infektion von Tieren mit APP, sie reduziert lediglich die Mortalitätsrate und das Ausmaß von Lungenläsionen (DUBREUIL et al., 2000; ŠATRÁN et al., 2003). Die Infektiosität geimpfter Tiere ist um das zehnfache niedriger verglichen mit ungeimpften Tieren (VELTHUIS et al., 2003).

APP-Impfstoffe gibt es als inaktivierte Ganzzellvakzine, als genetisch

inaktivierte Ghostvakzine, als Subunit-Vakzine und als Lebend-Impfstoff (RAMJEET et al., 2008). Impfstoffe mit abgetöteten Ganzzellbakterien sind in der Lage, bei homologen ST eine Reduktion der Mortalitätsrate zu erreichen. Das Auftreten von Lungenläsionen kann durch diese Art von Impfstoff jedoch nicht signifikant reduziert werden. Des Weiteren gibt es keine Protektion gegen heterologe ST (HAESEBROUCK et al., 1997). Es ist eines der Hauptprobleme der inaktivierten Ganzzellvakzine, dass es durch diese Impfstoffe zu keiner Antikörper-Bildung gegen Apx I-III kommt (DEVENISH et al., 1990; RAMJEET et al., 2008). Apx I-III sind die entscheidenden Bestandteile einer Subunit-Vakzine. Durch neutralisierende Antikörper gegen Apx kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Mortalität und dem Ausmaß von Lungenläsionen (DEVENISH et al., 1990; INZANA et al., 1991; ŠATRÁN et al., 2003). Subunit-Vakzine benötigen für eine effektive Reduktion der Mortalität und Lungenläsionen weitere rekombinante, ST-spezifische AG (GERLACH et al., 1993). Die APP-Oberflächenkomponenten sind zwar hoch immunogen und protektiv, jedoch weisen die LPS und CPS eine hohe Heterogenität zwischen den verschiedenen ST auf, wodurch sie sich für einen Impfstoff nur begrenzt eignen (PERRY et al., 1990; RIOUX et al., 1998; RAMJEET et al., 2008). Auch die meisten OMP unterscheiden sich zu stark, um für einen Impfstoff attraktiv zu sein (RAPP & ROSS, 1986). Einzelne OMP werden von allen und andere OMP werden zumindest von den meisten APP ST ausgebildet. Hierzu zählen das TbpB (CALMETTES et al., 2011), das 50kDA Lipoprotein OmlA (GERLACH et al., 1993), das 14 kDA PalA Protein (FREY et al., 1996) und das 42 kDA maltose-induzierte Protein (DENEER & POTTER, 1989). Subunit-Vakzine wirken ST-unabhängig effektiv gegen die APP-Läsionen (HAESEBROUCK et al., 1997).

In der Literatur ist ein Impfschema zur Grundimmunisierung von Ferkeln in der sechsten Lebenswoche mit einer Boosterung in der zehnten Lebenswoche beschrieben (ŠATRÁN et al., 2003). Ein Antikörper-Anstieg kann ab zwei Wochen nach der ersten Impfung verzeichnet werden und hält bis zum 42. Tag nach der zweiten Impfung an (SJÖLUND et al., 2011). Allerdings kann eine belastbare Protektion gegen APP bei experimentell infizierten Tieren bereits zwei Wochen nach Abschluss der Grundimmunisierung demonstriert werden (ŠATRÁN et al., 2003). JIRAWATTANAPONG et al., (2008) zeigen durch ein abweichendes Impfschemata mit einer dritten Impfung in der 14. Woche, dass es bei frühen Impfungen noch starke Interferenzen zu maternalen Antikörpern gibt.

Daher empfehlen die Autoren den Impfzeitpunkt bei hohen maternalen Antikörpertitern in die zehnte und 14. Lebenswoche zu verschieben. Sauen werden in der dritten und sechsten Woche *ante partum* geimpft, danach steigt der Antikörpergehalt im Kolostrums signifikant an (KRISTENSEN et al., 2004a).

1.8. Diagnostik von *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Die Diagnose einer akuten APP-Erkrankung ist durch die markanten klinischen Anzeichen, die typischen pathologischen Veränderungen sowie durch eine Isolation des Erregers beziehungsweise durch einen spezifischen DNA-Nachweis in der Lunge unproblematisch. Des Weiteren ist die Diagnose einer subklinischen oder chronischen APP-Infektion durch serologische Tests unkompliziert durchzuführen. Hingegen stellt sich die Detektion von APP-Carriertieren deutlich anspruchsvoller dar. Die erfolgreiche Kontrolle über die Pleuropneumonie hängt stark von einer präzisen und frühen Diagnose der Infektion ab (DUBREUIL et al., 2000).

Es gibt verschiedene Arten der Gewinnung von Probenmaterialien, die sich für die Bestimmung von APP-Antikörper, dem DNA-Nachweis oder dem Erregernachweis eignen. Bei Sektionen oder auch bei Untersuchungen von Lungen am Schlachtband können von verändertem Lungengewebe Proben entnommen werden (SHOPE, 1964; FITTIPALDI et al., 2003). Für serologische Untersuchungen werden in der Regel Blutproben durch Venenpunktionen entnommen (FABLET et al., 2017). Tonsillenkratzproben eignen sich für den DNA-Nachweis und die bakteriologische Anzucht (CHIERS et al., 2001). Zu diesem Zweck müssen das zu beprobende Tier durch eine Oberkieferschlinge fixiert und das Maul gespreizt werden, um die Kratzprobe an den Tonsillen entnehmen zu können (COSTA et al., 2011; DRON et al., 2012). Zur BALF Gewinnung ist das Schwein zu narkotisieren und im Anschluss mittels eines Katheters die Lunge mit Flüssigkeit zu spülen (VAN LEENGOED & KAMP, 1989).

1.8.1. Kulturelle Anzucht

Die bakteriologische Untersuchung von typisch betroffenen Lungenarealen ist eine geeignete diagnostische Methode (GROßE BEILAGE et al., 2013). Lungen von unbehandelten, sowohl perakut als auch akut infizierten Tieren eignen sich für dieses Verfahren, wohingegen bei chronisch infizierten Tieren die kulturelle Anzucht aus Lungensequestern oder aus einer fibrinösen Pleuritis oft negativ

ausfällt (GOTTSCHALK, 2019).

Der bakteriologische Nachweis von APP aus den Tonsillen gelingt frequenter als aus den Nasenhöhlen. Jedoch ist die Anzucht von Tonsillenproben problematisch, da sich die Erreger tief in den Krypten der Tonsillen befinden. Bei bakteriologischen Untersuchungen wird APP häufig von der kommensalen Begleitflora auf den Tonsillen überwuchert. Diese Überwucherung kann durch Selektivnährböden deutlich vermindert werden. Allerdings ist insgesamt die bakteriologische Nachweisrate des Erregers von den Tonsillen relativ niedrig und wird nur noch sporadisch genutzt (SIDIBE et al., 1993; CHIERS et al., 2002a; TOBIAS et al., 2012; GOTTSCHALK, 2015). Die BALF eignet sich ebenfalls nicht für die bakterielle Kultivierung von APP (PALZER et al., 2008).

1.8.2. Serologie

Der Gebrauch serologischer Tests zur Identifizierung von Tieren, die eine humorale Immunantwort gegen APP ausgebildet haben, ist ein wichtiger Bestandteil der Prävention und Überwachung von APP. Für den serologischen Nachweis von Antikörper gegen unterschiedliche AG, wie den Apx, LPS, CPS und Oberflächenproteine gibt es verschiedene Verfahren (DUBREUIL et al., 2000). Das AG, welches bei dem jeweiligen Verfahren genutzt wird, ist entscheidend für die Sensitivität und Spezifität des serologischen Tests (GOTTSCHALK et al., 1997; KLAUSEN et al., 2007).

Bei den etabliertesten Nachweisverfahren handelt es sich um die Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) und Komplementbindungsreaktionen (KBR). Lange Zeit war die KBR die anerkannte Referenzmethode (DUBREUIL et al., 2000; KLAUSEN et al., 2007). Es zeigt sich, dass die ELISA den KBR sowohl bei der Sensitivität als auch Spezifität überlegen sind (KLAUSEN et al., 2007; OPRIESSNIG et al., 2013). Zusätzlich ist nach KLAUSEN et al. (2007) die KBR mühsam, zeitintensiv und kostenintensiv, wohingegen die ELISA sehr praktikabel und automatisiert ablaufen (KLAUSEN et al., 2007).

Apx I-IV bilden eine starke humorale Immunantwort aus dem entsprechend gut können die Antikörper mittels Apx-ELISA nachgewiesen werden (NIELSEN et al., 2000; DREYFUS et al., 2004). Die ST 1, 5a und b, 9, 10, 11, 14 und 16 bilden das Apx I (BECK et al., 1994; NIELSEN et al., 2000; SÁRKÖZI et al., 2015; BARRERA-ZARATE et al., 2019). Zu Kreuzreaktionen kommt es durch das von *A. suis* gebildete Apx I (VAN OSTAAIJEN et al., 1997; SCHALLER et al., 2000).

Alle 18 ST, exklusiv ST 10 und 14, sezernieren Apx II (BECK et al., 1994; NIELSEN et al., 1997; NIELSEN et al., 2000; BLACKALL et al., 2002; SÁRKÖZI et al., 2015; BOSSÉ et al., 2018b). Es wird aber auch von anderen Bakterien, wie dem *A. suis*, *A. rossii* (VAN OSTAAIJEN et al., 1997; SCHALLER et al., 2000) und *A. porcitosillarum* gebildet (KUHNERT et al., 2005). Apx III, welches von den ST 2, 3, 4, 6, 8 und 15 produziert wird, weist Kreuzreaktionen mit dem RTX-Toxin PaxA der *Pasteurella aerogenes* auf (BECK et al., 1994; KUHNERT et al., 2000; BLACKALL et al., 2002).

Des Weiteren sezernieren *A. seminis*, *A. equuli* und *Pasteurella aerogene* Proteine, die eine 80-100 kDA geringere Molekularmasse als die Apx I-III aufweisen und mit diesen kreuzreagieren (SCHALLER et al., 2000). Zusätzlich zeigen die Apx I-III mit anderen RTX-toxinbildenden, gramnegativen Bakterien Kreuzreaktionen, da sie sich in Größe und antigenetischen Eigenschaften ähneln. Hierzu zählen die von den alpha-haemolysierenden *Escherichia coli* gebildeten Toxine hlyA und die von den *Pasteurella haemolytica* produzierten Leukotoxine lktA (DEVENISH et al., 1989). Nach experimenteller Infektion ist ein Antikörperrnachweis serotypabhängig und kann gegen Apx I zwischen 7-21 Tagen p. inf. und gegen Apx II und III zwischen sieben-vierzehn Tagen p. inf. detektiert werden. Der Antikörper-Anstieg p. inf. dauert zwei bis drei Wochen an (GIMENEZ-LIROLA et al., 2014). Es ist zu beachten, dass Antikörper-Nachweise gegen Apx I-III wenig spezifisch sind und ein Zusammenhang zwischen den ST und den serologisch nachgewiesenen Apx Antikörpern nicht eindeutig ist (NIELSEN et al., 2000; GIMENEZ-LIROLA et al., 2014).

Ein APP speziesspezifischer Nachweis ist durch den Apx IVA Antikörperrnachweis möglich (SCHALLER et al., 1999), da das Exotoxin zum einen von allen APP ST gebildet und andererseits von keinem anderen bekannten Mikroorganismus sezerniert wird (DREYFUS et al., 2004; SÁRKÖZI et al., 2015; BOSSÉ et al., 2018b). Apx IVA wird ausschließlich in vivo von akut, chronisch und subklinisch infizierten Tieren produziert. Voraussetzung dafür ist eine aktive Replikation (SCHALLER et al., 1999; DREYFUS et al., 2004). Eine APP-Infektion der Tonsillen ist nicht ausreichend für eine Apx IVA Bildung. Daher können Carriertiere nicht sicher über den Apx IV Antikörperrnachweis identifiziert werden (DUBREUIL et al., 2000; DREYFUS et al., 2004).

DREYFUS et al. (2004) entwickeln einen ELISA, der gegen das N'terminale Ende des Apx IVA Antikörper zielt. Dieser ELISA besitzt eine Spezifität von

100% und eine Sensitivität von 93,8% (OPRIESSNIG et al., 2013). Speziell gegen Apx IVA wird die Serokonversion mit drei Wochen p. inf. beschrieben und der Antikörper-Anstieg hält bis 55 Tage p. inf. an. Bei experimentell infizierten Tieren gelingt der früheste Apx IVA Antikörpernachweis bereits am siebten Tage p. inf. (OPRIESSNIG et al., 2013). Der Apx IVA Antikörpernachweis im Serum ist mit bis zu 120 Tage p. inf. beschrieben (DREYFUS et al., 2004). Des Weiteren zeigen die Autoren, dass eine Differenzierung zwischen infizierten und vakzinierten Tieren (DIVA) durch den Apx IVA Antikörpernachweis möglich ist. Nach einer Impfung mit einer Apx I-III und OMP Subunit-Vakzine bleibt eine Apx IVA Serokonversion aus (DREYFUS et al., 2004).

Apx IVA wurde bei der Analyse einer Subunit-Vakzine für die ST 1, 2 und 5 nachgewiesen. Das detektierte Apx IV Toxin entstand untypischerweise unter in vitro Bedingungen bei der Impfstoffherstellung. Es wird vermutet, dass spezifische Wachstumsbedingungen, unter anderem die Eisenrestriktion, mitverantwortlich für die in vitro Apx IVA Bildung ist (BUETTNER et al., 2011). Des Weiteren beschreiben TEGETMEYER et al. (2008) einen APP ST 7 Stamm, welcher über ein Insertionselement ISAp1 verfügt, das in verschiedene Bereiche des Genoms eingreift. Bei diesem ST wird die Apx IVA Expression gehemmt. O'NEILL et al. (2010) finden das Insertionselement jedoch lediglich in den Bla-und Cps Genen.

Zur Überwachung der Freiheit von APP-Infektionen ist der Apx IVA ELISA geeignet. Da jedoch viele Herden mit mindestens einem wenig virulenten oder avirulenten APP ST infiziert sind, ist die Aussagekraft hinsichtlich eines Apx IVA positiven Ergebnisses in Bezug auf virulente APP ST limitiert (GOTTSCALK, 2019). Mit zunehmendem Alter steigt die Nachweisrate der Apx IVA positiven Tiere an (OPRIESSNIG et al., 2013). Besonders bei Jungtieren besteht die Gefahr, dass es zu Fehlinterpretationen durch maternalen Antikörper kommt (VIGRE et al., 2003).

Neben den klassischen Apx-ELISA werden immer wieder neue Methoden entwickelt, um Antikörper gegen Apx nachzuweisen. Hierzu zählen beispielsweise für den Apx IVA Antikörpernachweis die gold-abhängigen Chemilumineszenz Immunoassays (HU et al., 2008), die Quantum-Dot-Gold basierten indirekten Fluoreszenz Immunoassays (SHENG et al., 2009) oder die Magnetpartikel-basierenden, enzymatischen, spektrofluorometrischen Assays

(WEI et al., 2012).

Weitere APP-Bestandteile, die sich für einen Antikörnernachweis eignen, sind die OMP (DUBREUIL et al., 2000). Die meisten OMP von APP weisen eine starke Heterogenität zwischen den APP ST auf, sodass sie sich nicht für die Speziesidentifikation eignen (RAPP & ROSS, 1986). Zumindest einige OMP werden jedoch von den meisten ST ausgebildet und sind für einen Antikörnernachweis geeignet (RAMJEET et al., 2008).

Das 42 kDa maltose-abhängige OMP wird von allen APP ST ausgebildet mit Ausnahme des ST 4 (DENEER & POTTER, 1989). ELISA, basierend auf AK gegen das 42 kDa OMP, werden häufig zusammen mit ELISA gegen die Apx I-III eingesetzt. Eine humorale Immunantwort wird drei Wochen nach einer Impfung mit einer Apx I-III und 42 kDa OMP Subunit-Vakzine erreicht, sodass hierdurch ein Impferfolg kontrolliert werden kann (TUMAMAO et al., 2004a). Das omlA wird von allen APP ST gebildet und erzeugt eine starke humorale Immunantwort. Die Antikörper können sieben Tage p. inf. nachgewiesen werden (GERLACH et al., 1993). Das 14 kDa OMP der PAL-Familie besitzt ebenfalls eine starke Immunantwort, wird jedoch auch von weiteren Mitgliedern des Genus *Pasteurellaceae* exprimiert (FREY et al., 1996).

Der Apx I ELISA wird gelegentlich um einen Antikörnernachweis gegen das Transferrin bindende Protein 2 (Tbp2) erweitert, um Stämme zu detektieren, die kein Apx I exprimieren (GROßE BEILAGE et al., 2013; OPRIESSNIG et al., 2013). Tfp werden ebenfalls von anderen Pasteurellaceae, wie *Glässerella parasuis* und *A. suis*, ausgebildet. In diesem Zusammenhang werden Kreuzreaktionen beschrieben (CALMETTES et al., 2011; OPRIESSNIG et al., 2013). Jedoch können OPRIESSNIG et al. (2013) mit einem Kombinations-ELISA von Apx I und Tbp2 keine Kreuzreaktionen zu *A. suis* feststellen.

Besonders stark immunogen wirken die CPS und LPS. Serotypabhängig können sieben bis vierzehn Tage p. inf. Antikörper im Serum und für zu acht Wochen p. inf. nachgewiesen werden (BOSSÉ et al., 1992; KREJCI et al., 2005; COSTA et al., 2011; OPRIESSNIG et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2017). Die Nutzung von CPS zur Serotypisierung ist möglich (INZANA & MATHISON, 1987), allerdings stellt sich die Gewinnung und die Reaktivität von reinem CPS schwierig dar und ist stark serotypabhängig (BOSSÉ et al., 1990; DUBREUIL et al., 2000). Es wird in der Routinediagnostik nicht eingesetzt (DUBREUIL et al.,

2000).

Antikörper gegen die O-Seitenketten der langkettigen Lipopolysaccharide (LC-LPS) werden auf Grund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität für die serologische Untersuchung eingesetzt. Die Gewinnung von LC-LPS ist durch wenige Bearbeitungsschritte möglich. Entscheidend ist, dass es keine Kontamination mit CPS oder rauem-LPS gibt, da dies zu Kreuzreaktionen führt (RADACOVICI et al., 1992; GOTTSCHALK et al., 1997).

Bei einigen ST ähneln sich die LPS O-Ketten, sodass eine serologische Differenzierung auf Basis der LPS nicht möglich ist. Diese Serotypgruppen sind 4/7, 3/6/8 und 1/9/11 (PERRY et al., 1990). Ebenfalls werden Kreuzreaktionen zwischen der Serotypengruppe 3/6/8 und ST 15 im LC-LPS ELISA beobachtet (PERRY et al., 2005; COSTA et al., 2011). Zu falsch-positiven Ergebnissen kommt es bei dem LC-LPS ELISA für die ST 1/9/11 durch das Bakterium *A. porcitonillarum* (GOTTSCHALK et al., 2003).

In einer weiteren Studie können OPRIESSNIG et al. (2013) je nach Testverfahren ab dem siebten Tag und sicher ab dem vierzehnten Tag p. inf. Antikörper gegen die LPS nachweisen. Eine Sensitivität von 74% wird allerdings nicht überschritten. Nach COSTA et al. (2011) kann bei experimentell infizierten Schweinen mittels Multi-APP ELISA (LC-LPS, der alle APP ST abdeckt) ab dem siebten Tag p. inf. LC- LPS Antikörper nachgewiesen werden. Dies ist eine Woche früher, als es mit den Einzelgruppen APP ELISA der ST 1/9/11, 2, 3/6/8, 4/7, 5, 10 und 12 möglich ist (COSTA et al., 2011). In der Literatur wird beschrieben, dass die LPS Antikörperbildung früher als die Apx IV Antikörperbildung stattfindet (OPRIESSNIG et al., 2013).

1.8.3. Polymerase Chain Reaktion

Ein Erregernachweis mittels Polymerase Chain Reaktion (PCR) basiert auf dem spezifischen Nachweis von DNA (MULLIS, 1990). Als Untersuchungsmaterial können je nach PCR Lungengewebe, Bakterienkulturen, Tonsillenkratzproben, Nasentupfer, BALF und nach ersten Versuchen auch oral fluid Proben verwendet werden (LO et al., 1998; SCHALLER et al., 2001; COSTA et al., 2012; TOBIAS et al., 2012; GROßE BEILAGE et al., 2013).

BECK et al. (1994) entwickeln verschiedene Primer, die auf die Gene der Apx I-III zielen. Die Autoren stellen eine hohe Korrelation zwischen den apx-Genprofilen und den ST fest. Weiterhin gibt das apx-Genprofil einen

Indikator für den Grad der Virulenz des jeweiligen ST an. Allerdings wird der Genotyp apxICABD auch von *A. suis* und *A. lignieresii*, der Genotyp apxIICABD von *A. porcitisillarum* und der Genotyp apxIICA von *A. rossii* und *A. suis* gebildet. Darüber hinaus wird der Genotyp apxIIICABD auch von *A. rossii* produziert (SCHALLER et al., 2000; KUHNERT et al., 2005).

Für einen speziesspezifischen APP-Nachweis eignet sich eine PCR, durch die Apx IV DNA nachgewiesen werden kann. Dafür ist ein auf dem 3'Ende des apxIVA-Gens basierender Primer geeignet, wohingegen das 5'Ende des apxIVA-Gens auch unspezifische Amplifikationen bei *A. lignieresii* zeigt. Bei einer vergleichenden Untersuchung von Lungen ist die Nachweisrate durch die Apx IVA nested PCR mit 94% wesentlich höher als durch eine bakteriologische Anzucht (76%), da die Apx IVA PCR DNA-Fragmente von Apx IV detektiert. Die Lebensfähigkeit der Bakterien ist für den spezifischen DNA-Nachweis nicht entscheidend (SCHALLER et al., 2001). Neben Tonsillenkratzproben und Lungenproben ist die PCR auch mit Nasentupfern erfolgreich getestet (FITTIPALDI et al., 2003). Der apxIVA Gennachweis ist auch mit einer quantitative real-time PCR (qPCR) möglich. Mit der qPCR wird bei Tonsillenkratzproben von experimentell infizierten Tieren eine Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 100% erreicht. Ein Vorteil der qPCR stellt bei epidemiologischen Studien und Herdenscreenings die quantitative DNA-Bestimmung dar (TOBIAS et al., 2012; GARIBYAN & AVASHIA, 2013).

Zur Typisierung wurde eine Multiplex PCR (mPCR) auf Basis aller vier Apx entwickelt. Allerdings ist eine Differenzierung zwischen den ST Kombinationen 2/8/15, 12/13, 9/11 und 5a/b nicht möglich (STHITMATEE et al., 2003; RAYAMAJHI et al., 2005). Weitere mPCRs zur ST Spezifizierung wurden für die ST 3/6/8 (ZHOU et al., 2008) und ST 1 bis 3, 5 bis 8, 10 und 12 (BOSSÉ et al., 2014) entwickelt. Auf diesen Untersuchungsergebnissen aufbauend ist ein mPCR-System für alle 18 ST entstanden, das aus zwei Einzel-mPCRs besteht, die jeweils mit einem apxIVA-Gen Nachweis kombiniert sind. Eine Unterscheidung der ST 9 und 1 ist nicht möglich (BOSSÉ et al., 2018a).

Eine weitestgehend eindeutige Einteilung der APP ST vom Biotyp 1 wird durch die Zusammenführung der Eigenschaften der Apx und der omlA beschrieben (GRAM et al., 2000); lediglich die ST Kombinationen 1/9/11 und 2/8 lassen sich durch dieses System nicht voneinander differenzieren (OSAKI et al., 1997; GRAM & AHRENS, 1998).

Die erste mPCR basierend auf dem *cps*-Gen kann mit zwei Primern, dem *cpx*-Gen (Export) und dem *cps*-Gen (Biosynthese) den ST 5 bestimmen. Vorteilhaft an einer mPCR auf *cps*-Basis ist, dass für einen ST Nachweis sowohl bakterielle Ganzzellen als auch infiziertes Gewebe verwendet werden kann (LO et al., 1998). Eine stetige Weiterentwicklung der mPCR auf *cps*-Basis hat dazu geführt, dass immer wieder neue ST integriert wurden. Es entstanden die mPCRs für die ST 1, 2 und 5 (ITO, 2010), ST 1, 2, 5 und 8 (SCHUCHERT et al., 2004), ST 1, 2, 5, 7 und 15 (ITO & SUEYOSHI, 2015). Weitere mPCRs aus Kombinationen von Genen auf der Basis von *cps* und *omlA* sind für die Serotypisierung der ST 2, 5 und 6 (JESSING et al., 2003) und 1, 7, und 12 (ANGEN et al., 2008) bekannt.

Es wurden verschiedene PCR Systeme für den APP-Nachweis oder die APP-Typisierung konstruiert. Sie basieren auf weiteren APP-Bestandteilen wie den Membranproteinen TbPA und TbPB (CALMETTES et al., 2011), dem *aroA*-Gen (Folsäure Stoffwechsel) (MORAL et al., 1999), dem *obgE*-Gen (GTPase) (ROSSI et al., 2014), dem *dsbE*-ähnlichen-Gen (Zytochrom C Biogenese) (CHIERIS et al., 2001; FITTIPALDI et al., 2003) und der zinkabhängigen-Metalloprotease (SERRANO-RUBIO et al., 2008). Des Weiteren wurde ein hoch sensitives und spezifisches DNA-Mikroarray entwickelt, das eine schnelle Identifizierung und Typisierung von bislang nicht typisierbaren ST ermöglicht (XIAO et al., 2009).

1.8.4. Lungenbeurteilung am Schlachthof

Lungenbeurteilungen am Schlachtband sind eine praktikable, effektive und kostengünstige Methode für das Monitoring der Lungengesundheit von Schweineherden (MEYNS et al., 2011). Während der Untersuchung von Schlachttierkörpern werden Veränderungen am Geschlinge beurteilt, wobei es für die Bewertung der Lungenveränderungen und Pleuraläsionen verschiedene Befunderhebungsschlüssel gibt (GROßE BEILAGE et al., 2013).

Bronchopneumonien lassen sich visuell erfassen, da sich das veränderte Gewebe farblich von dem unveränderten Gewebe deutlich absetzt (GROßE BEILAGE et al., 2013). Gehäuft kommen Läsionen einer Enzootischen Pneumonie (EP) im Bereich der Spitzenlappen vor, diese werden vorrangig von *M. hyopneumoniae* verursacht (GOTTSCHALK, 2019). Des Weiteren können Bronchopneumonien mit kranioventralen Konsolidierungen (EP-ähnliche Läsionen) durch die

Beteiligung von *Streptococcus suis*, *Glässerella parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* und *Trueperella pyogenes* auftreten (FRAILE et al., 2010; YAEGER & VAN ALSTINE, 2019). Visuell auch gut beurteilbar sind hämorrhagische-nekrotisierende Pneumonien (GROßE BEILAGE et al., 2013). Eine weitere Form der Pneumonie stellt die embolische Pneumonie mit charakteristischen, multiplen Abszessen dar (YAEGER & VAN ALSTINE, 2019). Interstitielle Pneumonien (vornehmlich Virusinfektionen) lassen sich bei den visuellen Lungenbeurteilung nicht von ödematösen Veränderungen des Interstitiums unterscheiden (GROßE BEILAGE et al., 2013).

Pleuritiden werden in dorso-kaudale und kranio-ventrale Pleuritiden eingeteilt, wobei die kranio-ventralen Pleuritiden mit der EP assoziiert sind, während die dorso-kaudalen Pleuritiden zumeist mit APP in Verbindung stehen (ANDREASEN et al., 2001; Merialdi et al., 2012).

Ursächlich für Pleuritiden können weitere Erreger sein, wie beispielsweise *Glässerella parasuis*, *M. hyorhinis* und *Streptococcus suis* (GROßE BEILAGE et al., 2013; YAEGER & VAN ALSTINE, 2019).

Als APP verdächtige Läsionen werden kaudo-dorsale Pleuritiden mit einer Veränderung des direkt darunter liegenden Lungengewebes angesehen (FABLET et al., 2012; Merialdi et al., 2012; GROßE BEILAGE et al., 2013). Palpatorisch lassen sich verfestigte Sequester (demarkiertes, nekrotisches Lungengewebe) von umliegendem Gewebe abgrenzen. In unklaren Fällen sollte verändertes Gewebe angeschnitten werden, wird dabei eine, nekrotisches Gewebe einschließende Kapsel identifiziert, ist dies verdächtig für APP (GROßE BEILAGE et al., 2013). Allerdings lassen die rein morphologischen Veränderungen keinen eindeutigen Rückschluss auf die Ätiologie zu (GROßE BEILAGE et al., 2013).

Limitierend hinsichtlich einer Aussagekraft einer Lungenbeurteilung am Schlachtband ist, dass Lungen- und Pleuraläsionen dynamische Prozesse darstellen. Aus diesem Grund ist eine Aussage über den zeitlichen Bezug nur begrenzt möglich (MEYNS et al., 2011). Zusätzlich besteht die Gefahr, dass pathologische Veränderungen morphologisch bereits vollkommen zurückgebildet sind und sich dadurch ein verfälschtes Bild zeigt (SIDLER et al., 2015).

2. Oral fluid samples

2.1. Einsatz von oral fluid samples

Die herkömmlichen Probenentnahmen am lebenden Tier, wie Blut- und Tonsillenkatzproben, Nasentupfer oder BALF sind für die Tiere und Probennehmer stressig, mühsam, gefährlich und kostenintensiv (VAN LEENGOED & KAMP, 1989; FITTIPALDI et al., 2003; COSTA et al., 2011; FABLET et al., 2017).

Eine vielversprechende Alternative hierzu bietet die Gewinnung von OFS. Große Vorteile der OFS stellen die einfache, schnelle, nicht invasive, tierfreundliche Anwendung und die Ermöglichung eines großen Stichprobenumfangs dar (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010; FABLET et al., 2017; BJUSTROM-KRAFT et al., 2018).

OFS ist als Flüssigkeit definiert, die durch absorptives Material aus dem Mund gewonnen wird (ATKINSON et al., 1993). Es handelt sich bei OFS um ein Gemisch aus Speichel, Sulkusflüssigkeit, Transsudate vom zirkulierenden System, Mikroorganismen, desquamierten, oralen Mukosazellen, Mukus, nasalen Exsudaten und Futterresten (TENOVUO, 1997; PUY, 2006; PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010).

Der Speichel wird von den Speicheldrüsen Glandula parotis, mandibularis, sublingualis monostomatica und polystomatica des Schweins sezerniert (THOMÉ, 1999; PUY, 2006) und besteht zu 99% aus Wasser und 1% aus organischen und anorganischen Molekülen (PUY, 2006).

BRILL und KRASSE (1958) können den passiven Transport von Gewebeflüssigkeit in das Zahnfach durch die intravenöse Injektion eines fluoreszierenden Farbstoffes bei Hunden beweisen. Dreißig Sekunden nach der Verabreichung wird das Färbemittel in dem Zahnfach von gesunden Hunden nachgewiesen. Der Transfer von AG wird durch die intravenöse Injektion von Coxsackie-B-1-Viren bei Hasen beschrieben. Dieses AG ist 2 Minuten nach der Gabe im OFS anzutreffen (MADONIA et al., 1966). Der Übertritt von Antikörper in die Sulkusflüssigkeit wurde bei Affen durch die intravenöse Verabreichung von gereinigtem und radioaktiv markiertem IgG, IgM und IgA gezeigt. In der Glandula parotis wird kein intaktes Ig entdeckt, woraus die Autoren schließen, dass vollfunktionsfähige Ig's vom Plasma nur in die

Sulkusflüssigkeit gelangen (CHALLACOMBE et al., 1978). Sulkusflüssigkeit tritt im Kapillarsystem unter dem Bindegewebe durch das Übergangsepithel in das Zahnfach ein (DELIMA & VAN DYKE, 2003). Die oralen mukosalen Transsudate sind Ultrafiltrate vom Blut und reflektieren den IgG und sIgA Gehalt im Serum (CAMERON & CARMAN, 2005).

In der Humanmedizin wird das Verfahren der OFS bei Screenings für Erreger verwendet wie beispielsweise dem Humanen Immundefizienz-Virus (HODINKA et al., 1998; BRANSON, 2007).

CORTHIER et al. (1977) berichten erstmalig über einen Antikörpernachweis in oralen Flüssigkeiten beim Schwein und weisen Antikörper gegen die Klassische Schweinepest in pharyngealen Sekreten nach.

Bei Screenings erfolgt der Nachweis von DNA und Antikörper gegen das PRRSV (PRICKETT et al., 2008b; KITTAWORNAT et al., 2012), das PCV 2 (PRICKETT et al., 2011; KITTAWORNAT et al., 2012) und gegen das *Influenza A Virus* (IAV) (GOODELL et al., 2013; PANYASING et al., 2013) routinemäßig aus OFS (PRICKETT et al., 2008a; BJUSTROM-KRAFT et al., 2018).

Auch für weitere Erreger ist der DNA und/oder Antikörpernachweis aus OFS beschrieben, wie beispielsweise für Rotlauf (GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2013), *M. hyosynoviae*, *M. hyorhinis* und *M. hyopneumoniae* (NETO et al., 2014; NETO et al., 2015; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017), *Lawsonia intracellularis* (BARRERA-ZARATE et al., 2019), *Porzine Epizootische Diarrhoe Virus* (BJUSTROM-KRAFT et al., 2016), *Streptococcus suis* sowie *Glässerella parasuis* (CHEONG et al., 2017) und auch für die Afrikanische und Klassische Schweinepest (MUR et al., 2013; DIETZE et al., 2017).

In einer ersten Untersuchung werden OFS zur Differenzierung des porcine respiratory disease complex (PRDC) verwendet. Mittels einer qPCR lassen sich die Erreger IAV, PRRSV, *M. hyopneumoniae* und PCV 2 identifizieren (CHEONG et al., 2017; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). In Korea werden in einer Studie OFS aus verschiedenen Beständen auf die Erreger PRRSV, PCV 2, *Pasteurella multocida*, *Glässerella parasuis*, APP, *M. hyopneumoniae* und *M. hyorhinis* und *Streptococcus suis* untersucht (CHEONG et al., 2017).

LOFTAGER et al. (1993) gelingt es erstmalig bei Schweinen APP IgA nach

intranasaler Inokulation in der BALF und aus nasalen Sekreten nachzuweisen.

Der Apx IV Antikörpernachweis ist bei experimentell infizierten Tieren beschrieben und zeigt serotypabhängige Nachweisraten. Der früheste signifikante Antikörper-Anstieg kann 21 Tage p. inf. für die IgG, IgM und IgA gemessen werden (GONZÁLEZ et al., 2017).

Der Nachweis von APP-DNA in der frühen Infektionsphase wird von COSTA et al. (2012) beschrieben. Es werden experimentell Tiere mit verschiedenen ST infiziert. Serotypabhängig wird DNA am ersten Tag p. inf., am siebten Tag p. inf. oder gar nicht in den OFS nachgewiesen. In einem in Australien durchgeführten Versuch, bei dem von Einzeltieren OFS untersucht werden, kann bei einem Tier in einer OFS APP-DNA nachgewiesen werden. Bei diesem Tier ist weder in einer Tonsillenkratzprobe APP nachweisbar noch ist es möglich APP-spezifische Antikörper nachzuweisen (DRON et al., 2012). Außerdem kann in einer weiteren Studie aus OFS von konventionellen Betrieben APP-DNA mittels PCR nachgewiesen werden (CHEONG et al., 2017).

2.2. Monitoring mit Hilfe von oral fluid samples

Der Eintrag APP infizierter Tiere in eine APP naive Herde stellt stets ein hohes Risiko dar. Zur Minimierung dieses Risiko bieten Monitoringprogramme eine Möglichkeit, infizierte Tiere frühzeitig zu erkennen (GOTTSCHALK, 2019). Die Kolonisationsdynamik von APP variiert stark und ist ST-abhängig (COSTA et al., 2011). Hoch virulente APP ST zeichnen sich durch eine niedrige Prävalenz aus, weswegen es von entscheidender Bedeutung ist, einen hohen Stichprobenumfang zu wählen, um auch diese hoch virulenten ST zu detektieren (GOTTSCHALK, 2019). Zur Klassifikation als „APP negativ“ Herde gibt es kein einheitlich anerkanntes Monitoringprogramm (SASSU et al., 2018). Gottschalk (zitiert nach SASSU et al., 2018) empfiehlt mindestens 30 Serumproben von 6 Monaten alten Tieren zwei bis viermal pro Jahr zu untersuchen. Nach NATHUES et al. (2013) sollten hingegen 15 Serum- oder Tonsillenkratzproben viermal jährlich ausgewertet werden. Eine dänische Zuchtorganisation stuft Betriebe nur als APP spezifisch pathogenfrei (SPF) ein, wenn jeden Monat 20 Tiere über einen Zeitraum von 24-36 Monaten negativ auf APP testen (SZANCER, 2008).

Für Screening- und Monitoringprogramme am lebenden Tier müssen Proben von mehreren Einzeltieren genommen werden. Diese Methoden sind zeit- und

kostenintensiv und darüber hinaus belastend für die Tiere (NATHUES et al., 2013; FABLET et al., 2017). Durch die Verwendung von OFS ist hingegen eine schnelle und nicht invasive sowie tierfreundliche Anwendung mit großem Stichprobenumfang von bis zu 25 Tieren pro OFS möglich. Daher eignet sich das Verfahren der OFS in besonderem Maße für Screening- und Monitoringprogramme und hat sich bereits in der Diagnostik in Schweinebeständen für verschiedenste Erreger etabliert (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010; FABLET et al., 2017; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017; BJUSTROM-KRAFT et al., 2018). Neben der einfachen und nicht invasiven Gewinnung von OFS, können COSTA et al. (2012) einen frühen APP spezifischen DNA-Nachweis (ein Tag p. inf.) bei experimentell infizierten Tieren zeigen. Dies ist ein weiteres vielversprechendes Argument für die frühzeitige und elegante Identifikation von APP infizierten Tieren durch OFS. Aussagekräftige Feldstudien über die Nachweisraten und -dauern von APP-DNA in OFS wurden bisher noch nicht veröffentlicht.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse des Nachweises von APP-DNA im OFS in zwei konventionellen Mastbetrieben. Im Einzelnen sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

- 1) In Mastbeständen mit APP infizierten Tieren ist Apx-DNA in OFS nachweisbar.
- 2) Der Nachweis von Apx IV DNA sowie Apx III und I DNA ist in OFS möglich.
- 3) Eine engmaschige Beprobung der Mastschweine mittels OFS ist für einen Apx-DNA-Nachweis vorteilhafter als eine einmalige oder weitmaschige Beprobung.

2. Versuchsbetriebe

2.1. Einschlusskriterium

Das alleinige Auswahlkriterium für die Versuchsbetriebe war der Nachweis von APP in vorherigen Mastdurchgängen.

2.2. Nachweise aus der Routinediagnostik

Im Vorfeld wurden sowohl in Betrieb A als auch in Betrieb B bei routinemäßigen Untersuchungen APP nachgewiesen. In beiden Betrieben war die bakteriologische Anzucht von APP möglich (vergleiche (vgl.) XI.1.) In Betrieb A wurden mittels einer multiplex Apx-Toxin PCR die APP ST 1/9/11 identifiziert (vgl. XI.1.1.). In Betrieb B wurden mittels einer Apx-Toxin PCR der APP ST 7 detektiert und mittels eines LPS-ELISA die ST Kombination 3/6/8 nachgewiesen (vgl. XI.1.2.).

2.3. Betriebsabläufe

Sowohl in Betrieb A als auch in Betrieb B werden die Schweine gemäß den Richtlinien der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung gehalten. Die Ställe sind mit Betonspaltenböden ausgestattet und Wasser steht den Tieren über Nippeltränken ad libitum zur Verfügung. Bei den Fütterungssystemen handelt es sich jeweils um eine sensorgesteuerte Flüssigfütterung am Langtrog. Als

Lüftungssystem wird sowohl in Betrieb A als auch in Betrieb B ein Unterdrucklüftungssystem verwendet. Bei dem Zuluftsystem handelt es sich im Betrieb A um eine Schlitzganglüftung mit Deckenelementen. In Betrieb B wird eine Türganglüftung mit einer Lochblechtür verwendet. Beide Betriebe mästen in einem abteilweisen Rein-Rausverfahren.

In den Ferkelerzeugerbetrieben von Betrieb A und Betrieb B werden jeweils die Sauen reproduktionsorientiert gegen das porcine Parvovirus, Rotlauf-Infektionen, PRRSV, IAV, *Escherichia coli* und *Clostridium perfringens* Typ C geimpft. Des Weiteren werden die Sauen einmal jährlich bestandsweise gegen PCV 2 und *M. hyopneumoniae* geimpft.

Die Ferkel von Betrieb A und Betrieb B werden in den Ferkelerzeugerbetrieben am 3. Lebenstag und beim Absetzen gegen *M. hyopneumoniae* (two-shot) geimpft. Des Weiteren werden die Ferkel beim Absetzen gegen PCV 2 und PRRSV geimpft. Zusätzlich werden in Betrieb A die Ferkel standardmäßig bei der Einstellung in die Mast und vier Wochen später gegen APP geimpft.

3. Versuchsablauf

3.1. Einstellung und Vorbereitungen

Die in den Versuch einbezogenen Ferkel wurden in ein gereinigtes und desinfiziertes Abteil eingestallt.

Betrieb A staltte 280 Ferkel mit durchschnittlich 21,2 kg Lebendgewicht in 8 Buchten zu jeweils 35 Tieren ein. Die Ferkel wurden am Tag der Einstellung (d0) und ein zweites Mal in der Woche (W) 4 mit 2 ml Porcilis® APP Chargennummer: A740A01 (Porcilis® APP; Intervet Deutschland GmbH; Unterschleißheim; Deutschland) intramuskulär (i.m.) vakziniert. Nach der zweiten Impfung wurden die 12 größten Schweine aus jeder Bucht aussortiert und in ein anderes Abteil eingestallt. Ab W 4 waren noch 23 Tiere pro Bucht in die Untersuchung integriert. Diese Gruppen blieben bis zur Schlachtung stabil.

Betrieb B teilte 216 Ferkel mit durchschnittlich 30,9 kg Lebendgewicht zu gleichen Teilen in 8 Buchten auf (27 Tiere pro Bucht). Bis zur Schlachtung wurden keine Änderungen an der Gruppenzusammensetzung vorgenommen. Die Schweine aus Betrieb B erhielten keine APP-Impfung.

3.2. Probenentnahmen

3.2.1. Oral fluid samples

3.2.1.1. Gewinnung von oral fluid samples

Für die Gewinnung der OFS wurde je 25 Tiere ein 1 cm dickes Baumwollseil (Oral Fluid Sample Collection Accessory Kit; IDEXX® Laboratories Inc., Westbrook, Maine; U.S.A.) für 20–30 Minuten pro Bucht an der Buchtenwand aufgehängt (PRICKETT et al., 2008b; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Die Seile waren in einem sauberen Bereich mit Distanz zu Tränken und Futtertrögen angebracht. Des Weiteren wurden die Seile so positioniert, dass keine Tiere aus der Nachbarchucht in der Lage waren, in direkten Kontakt mit den Seilen zu kommen (COSTA et al., 2012). Bei jeder Probengewinnung wurde die Position der Baumwollseile auf die Größe der wachsenden Tiere angepasst, sodass sich das untere Ende auf Schulterhöhe der Schweine befand (PRICKETT et al., 2008b; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Die Schweine interagieren mit dem Seilende und während der oralen Manipulation des Baumwollseils gelangen oral fluids (OF) an und in das Seil (FABLET et al., 2017). Nach der Expositionsphase wurden die OF durch Auswringen der durchtränkten Seile in Plastikbeutel extrahiert. Am Grund der Plastikbeutel befand sich ein integriertes, verschließbares 5 ml großes Auffangbehältnis (Oral Fluid Sample Collection Accessory Kit; IDEXX® Laboratories Inc.; Westbrook; Maine U.S.A.). In dieses Behältnis flossen die OF nach dem Auswringen. Das Auffangbehältnis wurde anschließend abgenommen und verschlossen (PRICKETT et al., 2008b). Für die Gewinnung jeder OFS wurden neue Einmalhandschuhe getragen, um Kreuzkontaminationen zu verhindern. Die OFS wurden mit Hilfe von Transferpipetten (Transferpipetten 2 ml; Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht; Deutschland) in Aufbewahrungsgefäße (Eppendorf® Safe-Lock Tube 1.5 ml; Eppendorf AG, Hamburg; Deutschland) pipettiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

3.2.1.2. Entnahmezeitpunkte

In Betrieb A und in Betrieb B wurden die Tiere in den einzelnen Buchten in der ersten Woche nach dem Einstellen (d0–7) täglich beprobt. Danach erfolgte eine OFS Probenentnahme in einem Abstand von jeweils zwei Wochen. Dies wird schematisch in Abbildung 1 und 2 dargestellt. Die Anzahl der OFS pro Bucht variierte nach Anzahl der Tiere (ein OFS pro 25 Tiere), sodass ein bis zwei OFS

genommen wurden. Im Betrieb A wurden in W 4 zusätzliche OFS gewonnen, da an diesem Tag die zweite APP-Impfung erfolgte. An den beiden Impfterminen (d0 und W 4) wurden die OFS unmittelbar vor der Impfung genommen.

Die Anzahl der zu jedem Zeitpunkt der Probengewinnung gewonnen OFS sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Zeitpunkte der Probengewinnung von oral fluid samples

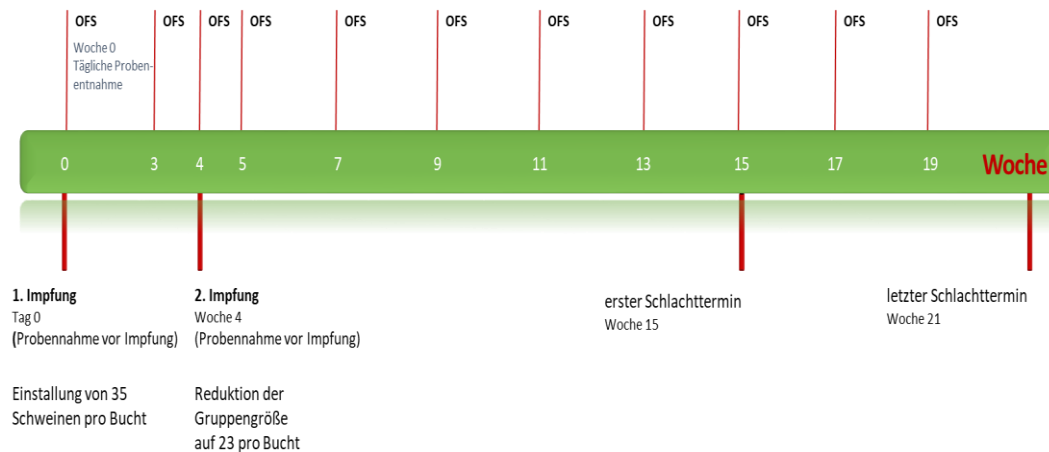


Abbildung 1: Zeitpunkte der Probengewinnung von OFS in Betrieb A mit Angaben zu Impfzeitpunkten, Zeitpunkt der Veränderung der Gruppengröße sowie des ersten und letzten Schlachttermins.

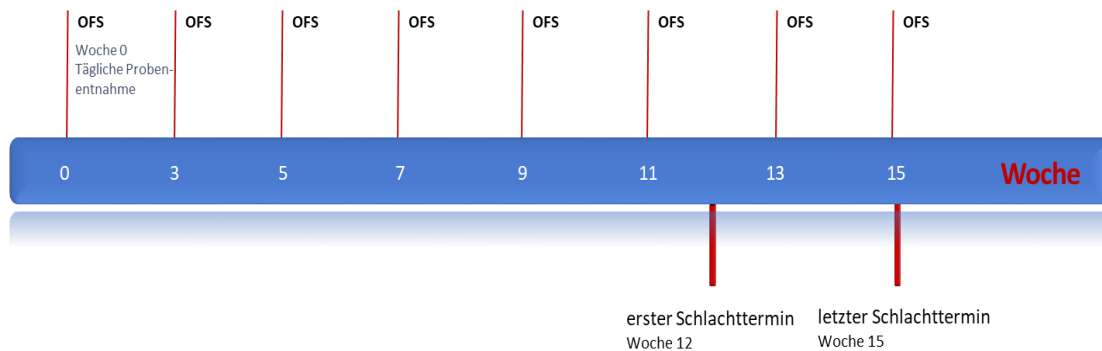


Abbildung 2: Zeitpunkte der Probengewinnung von OFS in Betrieb B mit Angaben des ersten und letzten Schlachttermins.

Tabelle 1: Anzahl gewonnener oral fluid samples zu den Zeitpunkten der Probengewinnung in Betrieb A und in Betrieb B.

Zeitpunkt nach Einstellung	Betrieb A	Betrieb B
D0-7	XX (Bucht 1-8)	XX (Bucht 1-8)
W 3	XX (Bucht 1-8)	XX (Bucht 1-8)
W 4	XX (Bucht 1-8)	-
W 5	X (Bucht 1-8)	XX (Bucht 1-8)
W 5,7,9,11	X (Bucht 1-8)	XX (Bucht 1-8)
W 13	X (Bucht 1-8)	XX (Bucht 1-4 & 7-8) X (Bucht 5 & 6)
W 15	X (Bucht 1-2 & 5-8)	X (Bucht 1-8)
W 17	X (Bucht 1-2 & 5-8)	-
W 19	X (Bucht 1,5,7,8)	-

X=1 OFS/ Bucht; XX= 2 OFS/Bucht; -=keine Probengewinnung

3.2.2. Stichblutproben

Die Schweine wurden in konventionellen Schlachthöfen mit einer EU-Zulassung geschlachtet. Während der Ausblutungsphase wurde von einem Teil der geschlachteten Tiere Stichblut in einem Serumröhrchen (S-Monovetten® Serum 9 ml; Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht; Deutschland) aufgefangen. Die Tiere und das von ihnen gewonnene Stichblut konnten eindeutig dem jeweiligen Betrieb, dem Abteil und der Bucht zugeordnet werden. Dies war durch Markierungen auf den Ohrmarken möglich, die den Tieren entsprechend der Viehverkehrsverordnung im Ferkelerzeugerbetrieb eingezogen wurden. Diese Markierungen wurden zwei Tage vor der Schlachtung mit einem Ohrmarke-Kennzeichen-Stift (Allflex® Ear Tag Marking Pen; Allflex USA Inc.; Dallas; Texas; USA) auf die Außenseite der Ohrmarken aufgetragen. Die Blutproben wurden am Tag der Probengewinnung mit dem 2403-fachen der mittleren Erdbeschleunigung abzentrifugiert (Hettich EBA 20; Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen; Deutschland). Die Seren wurden mit Hilfe von Transferpipetten (Transferpipette 2 ml; Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht; Deutschland) in Aufbewahrungsgefäße (Eppendorf® Safe-Lock Tube 1.5 ml; Eppendorf AG, Hamburg; Deutschland) überführt. Diese wurden bei -20°C bis zur weiteren Probenuntersuchung gelagert.

3.3. Lungenbeurteilung

Die Lungen der geschlachteten Schweine konnten den Betrieben, den Abteilen und der jeweiligen Bucht zugeordnet werden. Die Dokumentation erfolgte handschriftlich und wurden im Anschluss in eine Tabelle in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft EXCEL® (Version 2016, Microsoft Office, USA) übertragen.

3.3.1. Pleuritiden

Veränderungen der Pleura wurden mit Hilfe des Schlachthof Pleuritis Evaluations System (SPES Score) erfasst (DOTTORI et al., 2007). Hierbei werden das Vorkommen, das Ausmaß und die Lokalisation der Pleuritis mit einem Score von null bis vier beurteilt. Eine genaue Beschreibung des Score Systems ist in Tabelle 2 aufgeführt

Tabelle 2: Schlachthof Pleuritis Evaluations System (SPES Score) nach DOTTORI et al. (2007)

Score	Charakter der Pleuritis
0	Abwesenheit einer Pleuritis
1	Ventro-kraniale Pleuritis: Verklebungen zwischen den Lungenlappen bzw. an den ventro-kranialen Spitzenlappen
2	Dorso-kaudale monolaterale fokale Läsion
3	Bilaterale Läsion vom Typ 2 oder dorso-kaudale monolaterale Läsion > 1/3 des Hauptlappens
4	Ausgedehnte Läsion auf beiden Hauptlappen (beide > 1/3 betroffen)

3.3.2. Enzootische Pneumonie-ähnliche Läsionen

Des Weiteren wurden bei denselben Lungen pathologisch-anatomische Veränderungen des Lungenparenchyms durch das Madec Score-System (MADEC & KOBISCH, 1982) beurteilt, wobei jeder der sieben Lungenlappen nach Grad der Veränderung einen Score zwischen null (keine Veränderung) und vier (maximale Veränderung) erhält. Diese sieben einzelnen Scores werden addiert, sodass eine Lunge einen Gesamtscore zwischen null (keine Veränderung) und 28 (maximale Veränderung) erhält. Eine detaillierte Beschreibung ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Bewertungssystem für EP-ähnliche Läsionen betroffener Lungenbereiche eines jeden Lungenlappens (MADEC & KOBISCH, 1982).

Score	EP-ähnliche Läsion pro Lungenlappen
0	Keine Läsion
1	1-25%
2	26-50%
3	51-75%
4	76-100%

4. Probenanalyse

4.1. Molekularbiologische Untersuchung

Die von Betrieben A und Betrieb B aus den Buchten 1-8 zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen OFS wurden mittels einer konventionell erhältlichen APP qPCR (*Actinobacillus pleuropneumiae* qPCR test kit; BioCheck UK Ltd; Ascot; Großbritannien) (vgl. XI.2.) in einem Labor (Intervet International B.V.; Boxmeer; Niederlande) analysiert. Der Apx-DNA-Nachweis durch die qPCR ist für die Untersuchung von OFS validiert und die Primer der multiplex qPCR sind spezifisch für Apx IV (FAM-Kanal), Apx I (Cy-5 Kanal) und Apx III (Texas Red Kanal). Die jeweilige nachgewiesene DNA-Menge wird in Logarithmus (\log_{10}) Kopien (c) pro Mikroliter (μl) ($\log_{10} \text{ c}/\mu\text{l}$) angegeben.

4.2. Serologische Untersuchung

Die Stichblutproben wurden ebenfalls in einem Labor (Intervet International B.V.; Boxmeer; Niederlande) untersucht. Antikörper gegen Apx IV wurden durch einen kommerziell erhältlichen APP-Apx IV Antikörper Test (IDEXX® APP-ApxIV Ab Test; IDEXX® Laboratories Inc.; Westbrook, Maine; U.S.A.) bestimmt und als Verhältnis von Probenergebnis zu Positivkontrollergebnis in Prozent angegeben (S/P %). Werte >50% gelten als positiv, Werte von <40% als negativ und Werte zwischen 40% und 50% werden als fraglich eingestuft. Antikörper gegen Apx III-I und OMP wurden durch einen Inhouse-ELISA (Inhouse-ELISA Apx I, II, III und OMP; Intervet International B.V.; Boxmeer; Niederlande) bestimmt, wobei die Ergebnisse als $2\log$ Titer angegeben werden. Als positiv werden Ergebnisse größer $2\log 6,6$ gewertet. Ein Validierungsbericht liegt nicht vor.

5. Mastdauer

Von allen in der Studie einbezogenen Mastschweinen wurde die Mastdauer ermittelt. Die mittlere Mastdauer wird als durchschnittlicher Zeitraum zwischen dem Tag der Einstellung und Schlachtttag berechnet. Vorzeitig ausgeschiedene Tiere werden nicht berücksichtigt.

6. Statistik

Für die statistische Auswertung und die Erstellung von Diagrammen wurden das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics® (Version 26.0, IBM® SPSS Inc., Chicago, Illinois; USA) und das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft EXCEL® (Version 2016, Microsoft Office; USA) verwendet. Werte $p < 0,05$ galten als statistisch signifikant. Der Konfidenzintervall betrug 0,95.

6.1. Deskriptive Statistik

Mittels deskriptiver Statistik wurden die Nachweise von Apx-DNA in OFS, die Nachweise spezifischer Antikörper gegen Apx-Toxine und OMP in Stichblutproben, die Beurteilung von Lungen am Schlachtband und die mittlere Mastdauer beschrieben.

6.2. Statistische Analyse

Die für die statische Auswertung verwendeten Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung getestet. Bei nicht normalverteilten Daten wurde mittels Mann-Whitney-U Test oder Spearman-Rho Test eine statistische Analyse durchgeführt.

Es wurde überprüft, ob statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen folgenden Variablen bestehen: die gesamt nachgewiesene Apx IV, III und I (exkl. Apx I in Betrieb B) DNA-Menge in den OFS der verschiedenen Buchten (unabhängige Variable) aus denen jeweils die Tiere stammten, dem SPES Score (abhängige Variable) wie auch andererseits der Länge der Mastdauer der jeweiligen Tiere (abhängige Variable). Diese Variablen werden in Tabelle 4 genauer definiert.

Tabelle 4: Definition unabhängiger Variablen für die statistische Analyse möglicher Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen dieser Faktoren und der Höhe der gesamt nachgewiesenen Apx IV, III und I (exkl. Apx I in Betrieb B) DNA-Menge in OFS in den Buchten aus denen die Tiere kamen.

Abhängige Variable	Definition
SPES Score	SPES Score von Einzeltieren
SPES Score>0	SPES Score von Einzeltieren mit pathologischen Veränderungen
Mastdauer	Mastdauer von Einzeltieren

Der Zusammenhang zwischen der Mastdauer (abhängige Variable) von Einzeltieren aus verschiedenen Buchten und dem mindestens einmaligen Nachweis von Apx-DNA in OFS in den Buchten, aus denen die Tiere stammen (positiv/ negativ; unabhängige Variable), wurde mittels Mann-Whitney-U Test geprüft. Dies wurde lediglich für den Betrieb B für das Apx III Toxin durchgeführt, da ansonsten in dem jeweiligen Betrieb Apx-Toxine einheitlich in allen Buchten nachgewiesen bzw. nicht nachgewiesen wurde.

Ergänzend zu den vorgenannten Analysen wurde auf eine mögliche Korrelation zwischen der Länge der Mastdauer der Einzeltiere (abhängige Variable) und der Höhe der Lungenscores (SPES und Madec Score; unabhängige Variable) mittels eines Spearman-Rho Testes untersucht. Anschließend wurde auf eine potenziell vorliegende Assoziation zwischen dem Vorliegen von pathologischen Veränderungen an den beurteilten Lungen am Schlachtband (SPES>0 und Madec Score>0; unabhängige Variable) und der Länge der Mastdauer bei Einzeltieren (abhängige Variable) geprüft.

IV. ERGEBNISSE

1. Oral fluid samples

Innerhalb der ersten Woche nach dem Einstellen wurden die OFS täglich und im weiteren Verlauf im zweiwöchigen Abstand gewonnen. Eine zusätzliche Probenentnahme fand in Betrieb A in Woche 4 nach der Einnahme statt. Eine Übersicht über die Anzahl der gewonnenen und auswertbaren OFS ist in Tabelle 5 abgebildet.

Tabelle 5: Anzahl gewonnener und auswertbarer OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Betrieb A und Betrieb B (D=Tag nach der Einnahme, W=Woche nach der Einnahme).

	D 0-7	W 3	W 4	W 5	W 7	W 9	W 11	W 13	W 15	W 17	W 19	Summe
Betrieb A gewonnen	128	16	16	8	8	8	8	8	8	8	8	218
Betrieb A auswertbar	127	16	16	8	8	8	8	8	8	8	8	217
Betrieb B gewonnen	128	16	-	16	16	16	16	14	8	-	-	230
Betrieb B auswertbar	128	16	-	16	16	16	16	14	8	-	-	230

Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen der oral fluid samples

1.1. Apx-DNA in oral fluid samples auf Bestandsebene

Der DNA-Nachweis von Apx-Toxinen in OFS war in Betrieb A und Betrieb B möglich.

A) Betrieb A

In Betrieb A konnte Apx IV DNA in OFS nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte Apx III und Apx I DNA in OFS detektiert werden.

B) Betrieb B

In Betrieb B konnte Apx IV und Apx III DNA in OFS nachgewiesen werden.

Die über den gesamten Untersuchungszeitraum nachgewiesenen Mengen an DNA von Apx IV, III und I in OFS wurde jeweils für Betrieb A und Betrieb B addiert und in der Abbildung 3 dargestellt.

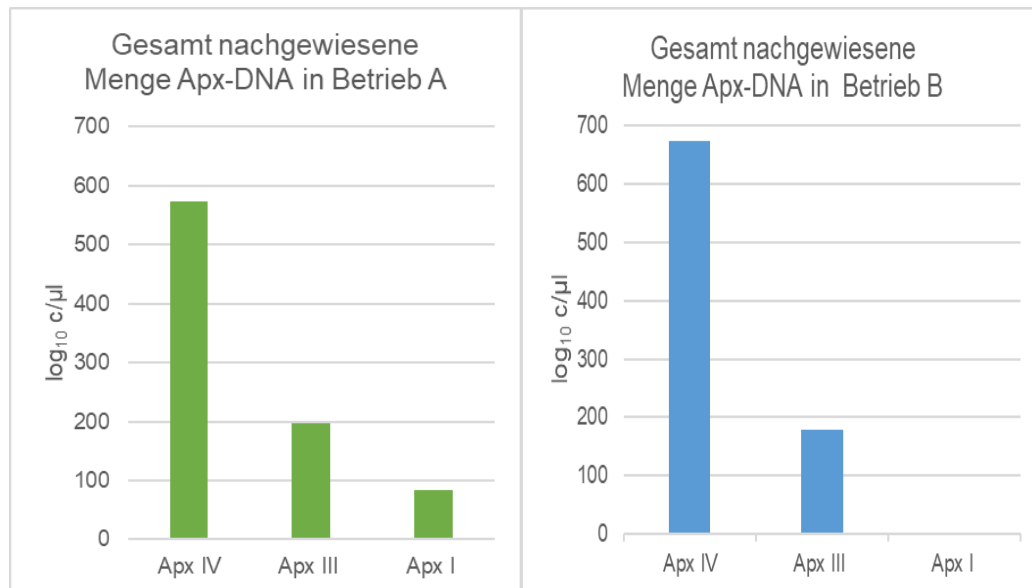


Abbildung 3: Summe der nachgewiesenen Mengen ($\log_{10} \text{ c}/\mu\text{l}$) an Apx IV, III und I DNA in OFS in Betrieb A und Betrieb B über den gesamten Untersuchungszeitraum.

1.2. Apx-DNA in oral fluid samples im zeitlichen Verlauf auf Bestandsebene

Die mittleren Gehalte an Apx IV, III und I (exkl. Apx I in Betrieb B) DNA in OFS an verschiedenen Zeitpunkten der Probengewinnung in Betrieb A und Betrieb B sind in den Abbildungen 4-7 dargestellt.

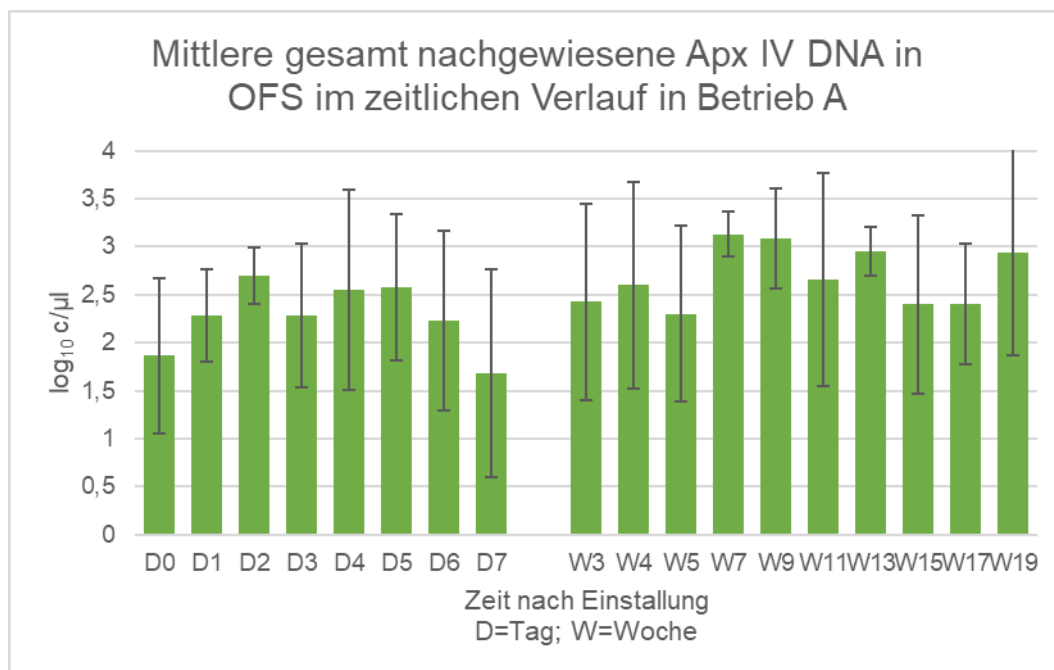


Abbildung 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamt nachgewiesenen Apx IV DNA in OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung von Schweinen in Betrieb A (n=16: D0-W4; n=8: W5-15; n=6: W17; n=3: W19).

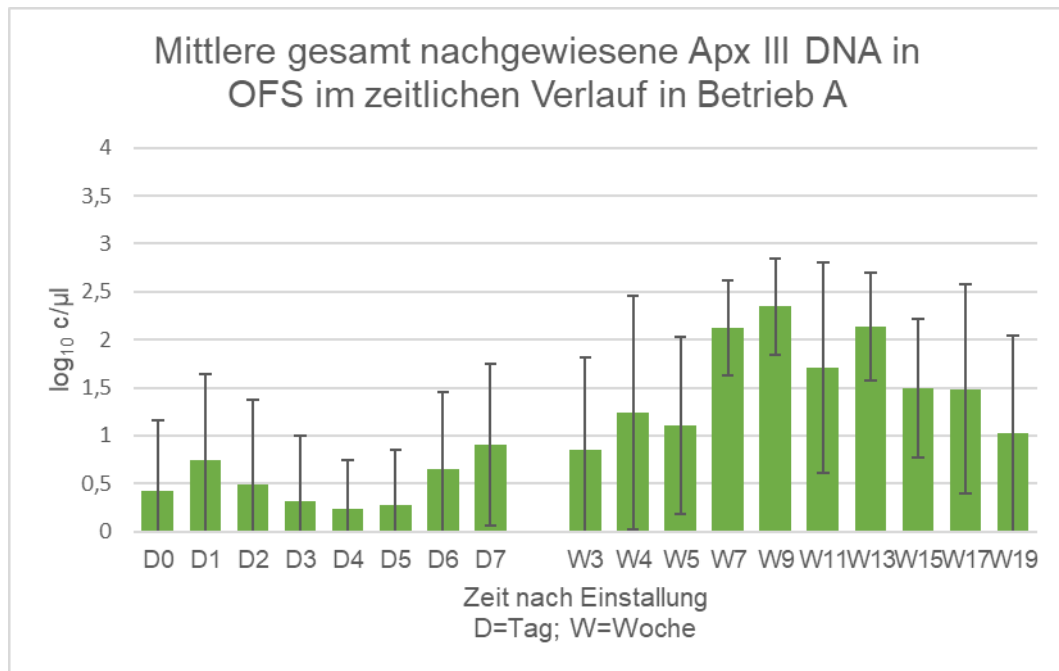


Abbildung 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamt nachgewiesenen Apx III DNA in OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung von Schweinen in Betrieb A (n=16: D0-W4; n=8: W5-15; n=6: W17; n=3: W19).

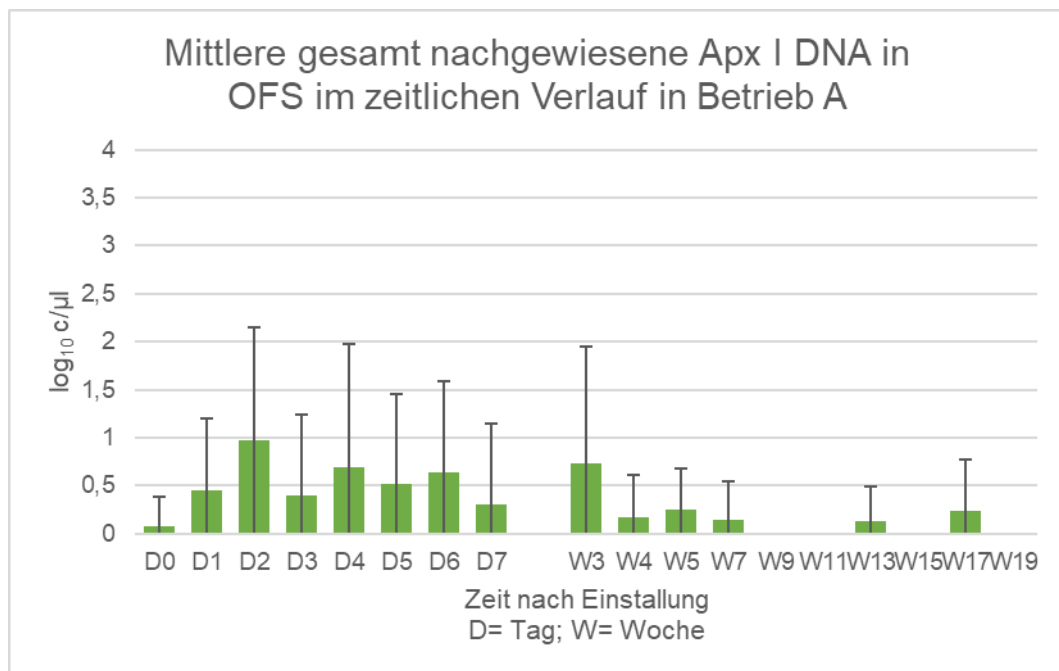


Abbildung 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamt nachgewiesenen Apx I DNA in OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung von Schweinen in Betrieb A (n=16: D0-W4; n=8: W5-15; n=6: W17; n=3: W19).

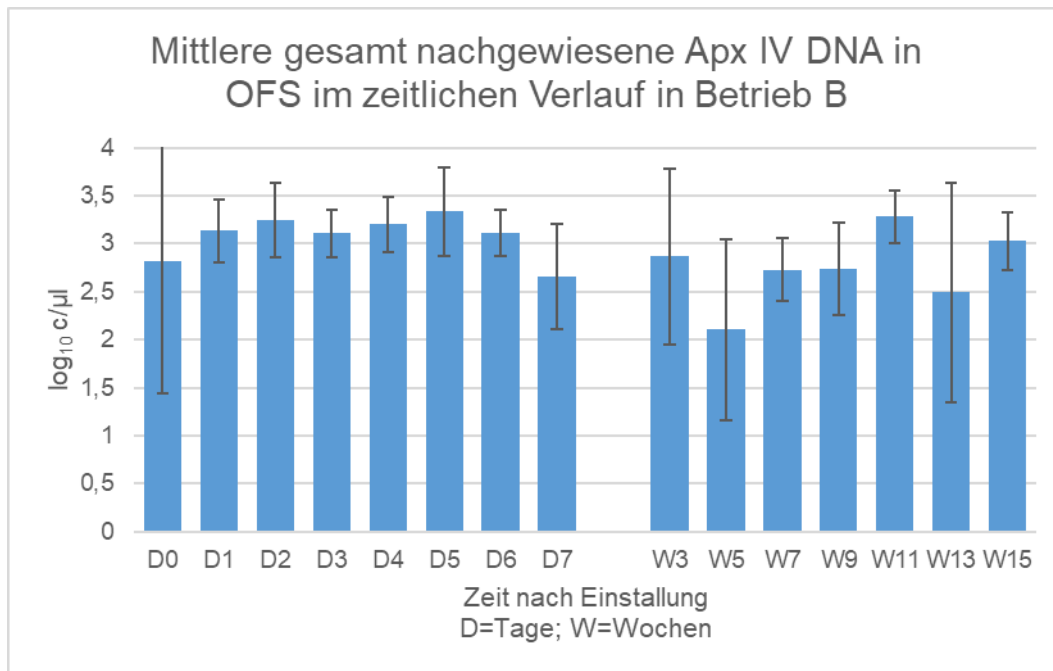


Abbildung 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamt nachgewiesenen Apx IV DNA in OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung von Schweinen in Betrieb B (n=16: D0-W11; n=14: W13; n=8: W15).

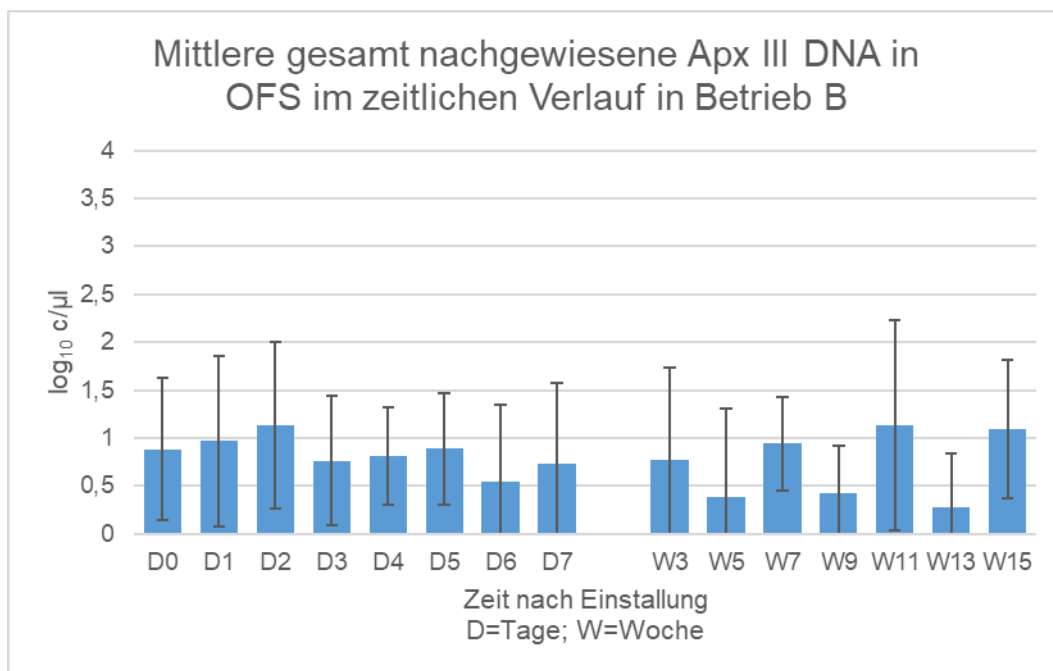


Abbildung 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamt nachgewiesenen Apx III DNA in OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung von Schweinen in Betrieb B (n=16: D0-W11; n=14: W13; n=8: W15).

1.3. Apx-DNA in oral fluid samples als Einzelproben

Die Nachweisrate (%) von Apx IV, III und I DNA aller ausgewerteten OFS in Betrieb A und Betrieb B sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Nachweisrate (%) und absolute Nachweise (n) von Apx IV, III und I DNA aller auswertbaren OFS in Betrieb A und Betrieb B.

	Positive OFS Betrieb A		Positive OFS Betrieb B	
	%	n	%	n
OFS gesamt	100	217	100	230
Apx IV	91,7	199	96,5	222
Apx III	47,9	104	38,3	88
Apx I	19,4	42	0	0

1.4. Apx-DNA in oral fluid samples aller untersuchten Buchten

Jede Bucht stellte zu jedem Zeitpunkt der Probengewinnung ein eigenständiges Ergebnis dar. In Betrieb A war dabei zu berücksichtigen, dass am Ende der Mastphase einige Buchten nicht mehr beprobt wurden, da die Tiere dieser Buchten zu diesem Zeitpunkt bereits geschlachtet waren. Die Nachweisrate (%) und die absoluten Nachweise (n) der Apx IV, III und I DNA aller untersuchten Buchten in Betrieb A und Betrieb B werden in Tabelle 7 aufgelistet. Eine Bucht wurde für ein Apx-Toxin zu einem Untersuchungszeitpunkt als positiv gewertet, sofern bei mindestens einem OFS ein DNA-Nachweis gelang.

Tabelle 7: Nachweisrate (%) und absolute Nachweise (n) von Apx IV, III und I DNA aller Buchten in OFS in Betrieb A und Betrieb B. Jede Bucht wird zu jedem Zeitpunkt der Probengewinnung als eigenständiges Ergebnis gewertet.

	Positive Buchten Betrieb A		Positive Buchten Betrieb B	
	%	n	%	n
Buchten gesamt	100	138	100	120
Apx IV	97,8	135	100	120
Apx III	65,9	91	47,5	57
Apx I	22,5	31	0	0

1.5. Apx-DNA in oral fluid samples verschiedener Buchten über im Zeitverlauf

Die Nachweisrate (%) und die absoluten Nachweise (n) von Apx IV, III und I DNA in OFS der einzelnen Buchten für alle Untersuchungszeitpunkte sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Anzahl der Probengewinnung variierte in Betrieb A, da sich die maximale Mastdauer in den verschiedenen Buchten unterscheidet. Eine Bucht wurde für ein Apx-Toxin zu einem Untersuchungszeitpunkt als positiv gewertet, sofern bei mindestens einem OFS ein DNA-Nachweis gelang.

Tabelle 8: Nachweisrate (%) und absolute Nachweise (n) von Apx IV, III und I DNA in OFS in verschiedenen Buchten über den gesamten Beprobungszeitraum in Betrieb A und Betrieb B. Die Anzahl der Beprobungszeitpunkte variiert abhängig von der maximalen Mastdauer.

		Bucht 1	Bucht 2	Bucht 3	Bucht 4	Bucht 5	Bucht 6	Bucht 7	Bucht 8
Betrieb A	Apx IV	94,4% (17/18)	94,1% (16/17)	100% (16/16)	93,8% (15/16)	100% (18/18)	100% (17/17)	100% (18/18)	100% (18/18)
	Apx III	77,8% (14/18)	70,6% (12/17)	56,3% (9/16)	62,5% (10/16)	66,7% (12/18)	64,7% (11/17)	72,2% (13/18)	55,6% (10/18)
	Apx I	11,1% (2/18)	17,7% (3/17)	18,8% (3/16)	6,3% (1/16)	22,2% (4/18)	35,3% (6/17)	38,9% (7/18)	27,8% (5/18)
Betrieb B	Apx IV	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)	100% (15/15)
	Apx III	93,3% (14/15)	93,3% (14/15)	86,7% (13/15)	40% (6/15)	0% (0/15)	0% (0/15)	0% (0/15)	66,6% (10/15)
	Apx I	0% (0/15)	0% (0/15)	0% (0/15)	0% (0/15)	0% (0/15)	0% (0/15)	0% (0/15)	0% (0/15)

Die Nachweise (n) von Apx IV, III und I (exkl. Apx I für Betrieb B) DNA in verschiedenen Buchten zu den einzelnen Zeitpunkten der Probengewinnung sind in den Abbildungen 9 und 10 für Betrieb A und in den Abbildungen 11 und 12 für Betrieb B abgebildet. Die nachgewiesenen DNA-Mengen an den einzelnen Zeitpunkten der Probengewinnung sind dabei semiquantitativ durch Farbskalen dargestellt. Zusätzlich sind für die Tage 0-7 und für den sonstigen Beprobungszeitraum die mittleren nachgewiesenen Apx-DNA-Mengen der einzelnen Buchten semiquantitativ dargestellt.

Die graphische Anordnung der Buchten ist an die im Betrieb vorhandenen räumlichen Gegebenheiten angelehnt und soll veranschaulichen, wie die Buchten zueinander liegen.

Apx IV DNA konnte in OFS, bis auf drei Ausnahmen in Betrieb A, dauerhaft in

allen Buchten zu jedem Untersuchungszeitpunkt nachgewiesen werden. Der Apx III DNA-Nachweis in OFS stellt sich in den verschiedenen Buchten in Betrieb A und in Betrieb B diskontinuierlich dar. Lediglich drei Buchten blieben in Betrieb B dauerhaft im Apx III DNA-Nachweis in OFS negativ. Apx I DNA in OFS konnte in Betrieb A in allen Buchten detektiert werden. Ein dauerhafter Nachweis von Apx III oder I DNA über alle Zeitpunkte der Probengewinnung gelang in keiner Bucht.

Nachgewiesene DNA-Menge von Apx IV, III und I in OFS je Bucht in Betrieb A an den Tagen 0-7 nach Einstellung und deren Mittelwert

		Zeit nach der Einstellung [Tag]									
		D 0	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7		D 0-7
Apx IV	Bucht	1									
		2									
		3									
		4									
		5									
		6									
		7									
		8									
Apx III	Bucht	1									
		2									
		3									
		4									
		5									
		6									
		7									
		8									
Apx I	Bucht	1									
		2									
		3									
		4									
		5									
		6									
		7									
		8									

Apx IV [log ₁₀ c/μl]	Apx III [log ₁₀ c/μl]	Apx I [log ₁₀ c/μl]
0	0	0
<1	<1	<1
1-1,5	1-1,5	1-1,5
1,5-2	1,5-2	1,5-2
2-2,5	2-2,5	2-2,5
2,5-3	2,5-3	2,5-3
>3	>3	>3

Abbildung 9: Nachgewiesene Apx IV, III und I DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten in Betrieb A an den Tagen 0-7 nach Einstellung und jeweils deren Mittelwert. Die nachgewiesene DNA-Menge ist semiquantitativ entsprechend der Farbskala dargestellt. Die Buchten 1-4 und 5-8 sind im Abteil sowie graphisch sichtbar nebeneinander angeordnet. Zwischen den Buchten 1-4 und 5-8 befindet sich ein Mittelgang. Die Buchten 1+8; 2+7; 3+6 und 4+5 liegen sich gegenüber.

Nachgewiesene DNA-Menge von Apx IV, III und I in OFS je Bucht in Betrieb A in den Wochen 3-19 nach Einstellung und deren Mittelwert

		Zeit nach der Einstellung [Wochen]										
		W 3	W 4	W 5	W 7	W 9	W 11	W 13	W 15	W 17	W 19	W3-19
Apx IV	Bucht	1										
		2								x		
		3							x	x		
		4							x	x		
		5										
		6								x		
		7										
		8										
Apx III	Bucht	1										
		2								x		
		3							x	x		
		4							x	x		
		5										
		6										
		7										
		8										
Apx I	Bucht	1										
		2								x		
		3							x	x		
		4							x	x		
		5										
		6								x		
		7										
		8										

Apx IV [log ₁₀ c/μl]	Apx III [log ₁₀ c/μl]	Apx I [log ₁₀ c/μl]	Sonstiges	
0	0	0	x	keine Probennahme
<1	<1	<1		
1-1,5	1-1,5	1-1,5		
1,5-2	1,5-2	1,5-2		
2-2,5	2-2,5	2-2,5		
2,5-3	2,5-3	2,5-3		
>3	>3	>3		

Abbildung 10: Nachgewiesene Apx IV, III und I DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten in Betrieb A in den Wochen 3-19 nach Einstellung und jeweils deren Mittelwert. Die nachgewiesene DNA-Menge ist semiquantitativ entsprechend der Farbskala dargestellt. Die Buchten 1-4 und 5-8 sind im Abteil, sowie graphisch sichtbar nebeneinander angeordnet. Zwischen den Buchten 1-4 und 5-8 befindet sich ein Mittelgang. Die Buchten 1+8; 2+7; 3+6 und 4+5 liegen sich gegenüber.

Nachgewiesene DNA-Menge von Apx IV und III in OFS je Bucht in Betrieb B an den Tagen 0-7 nach Einstellung und deren Mittelwert

		Zeit nach der Einstellung [Tagen]										
		D 0	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7		D 0-7	
Apx IV	Bucht	1										
		2										
		3										
		4										
		5										
		6										
		7										
	8											
Apx III	Bucht	1										
		2										
		3										
		4										
		5										
		6										
		7										
	8											

Apx IV [log ₁₀ c/μl]	Apx III [log ₁₀ c/μl]
0	0
<1	<1
1-1,5	1-1,5
1,5-2	1,5-2
2-2,5	2-2,5
2,5-3	2,5-3
>3	>3

Abbildung 11: Nachgewiesene Apx IV und III DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten in Betrieb B an den Tagen 0-7 nach Einstellung und jeweils deren Mittelwert. Die nachgewiesene DNA-Menge ist semiquantitativ entsprechend der Farbskala dargestellt. Die Buchten 1-4 und 5-8 sind im Abteil, sowie graphisch sichtbar nebeneinander angeordnet. Zwischen den Buchten 1-4 und 5-8 befindet sich ein Mittelgang. Die Buchten 1+8; 2+7; 3+6 und 4+5 liegen sich gegenüber.

Nachgewiesene DNA-Menge von Apx IV und III in OFS je Bucht in Betrieb B in den Wochen 3-15 nach Einstellung und der Mittelwert

		Zeit nach der Einstellung [Wochen]							
		W 3	W 5	W 7	W 9	W 11	W 13	W 15	W 3- 15
Apx IV	Bucht	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
		6							
		7							
		8							
Apx III	Bucht	1							
		2							
		3							
		4							
		5							
		6							
		7							
		8							

Apx IV	Apx III
[log ₁₀ c/μl]	[log ₁₀ c/μl]
0	0
<1	<1
1-1,5	1-1,5
1,5-2	1,5-2
2-2,5	2-2,5
2,5-3	2,5-3
>3	>3

Abbildung 12: Nachgewiesene Apx IV und III DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten in Betrieb B in den Wochen 3-15 nach Einstellung und jeweils deren Mittelwert. Die nachgewiesene DNA-Menge ist semiquantitativ entsprechend der Farbskala dargestellt. Die Buchten 1-4 und 5-8 sind im Abteil, sowie graphisch sichtbar nebeneinander angeordnet. Zwischen den Buchten 1-4 und 5-8 befindet sich ein Mittelgang. Die Buchten 1+8; 2+7; 3+6 und 4+5 liegen sich gegenüber.

2. Nachweis spezifischer Antikörper gegen Apx IV-I und OMP in Stichblutproben

Für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen Apx IV-I und gegen OMP wurden Stichblutproben untersucht. Hierfür wurden während des Schlachtvorganges 129 dem Betrieb A zuzurechnende und 155 dem Betrieb B zuzurechnende Stichblutproben gewonnen. Die Stichblutproben können eindeutig Tieren einer Bucht zugeordnet werden, wie dies in Tabelle 9 dargestellt ist.

Tabelle 9: Anzahl der gewonnenen und den Buchten zuordenbare Stichblutproben von Schweinen je Bucht aus Betrieb A und Betrieb B. Relativer Anteil der gewonnenen Blutproben an den insgesamt geschlachteten Tieren pro Betrieb.

	Bucht								Gesamt	Gesamt geschlachtete	Anteil gewonnener Proben
	1	2	3	4	5	6	7	8			
Betrieb A	16	16	18	13	20	18	17	11	129	183	70,5%
Betrieb B	16	20	20	19	19	14	26	21	155	215	72,1%

2.1. Nachweis spezifischer Antikörper auf Bestandsebene

Mittels ELISA konnten in Betrieb A und Betrieb B jeweils spezifische Antikörper gegen Apx IV, III, II, I und OMP nachgewiesen werden. Der Median der S/P Ratio des Apx IV wie auch die Mediane der Antikörpertiter gegen Apx III, II und I sowie gegen OMP sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Median der S/P Ratio % des Apx IV ELISA und Median der Antikörpertiter gegen Apx III, II, I und OMP aus Stichblutproben von Schweinen aus Betrieb A und Betrieb B. Zusätzlich Angaben: relative und absolute Anteile der als positiv, negativ und als fraglich gewerteten ELISA-Werte

	Betrieb A	Betrieb B
ELISA Apx IV [S/P Ratio%]	122,8%	173,8%
Positive Proben	91,5% (118/129)	94,2% (146/155)
Negative Proben	5,4% (7/129)	5,8% (9/155)
Fragliche Proben	3,1% (4/129)	-
ELISA Apx III [Titer 2log]	11,2	10,2
Positive Proben	100% (129/129)	100% (155/155)
ELISA Apx II [Titer 2log]	12,9	13,8
Positive Proben	100% (129/129)	100% (155/155)
ELISA Apx I [Titer 2log]	12,5	10
Positive Proben	100% (129/129)	100% (155/155)
ELISA OMP [Titer 2log]	9,9	7,6
Positive Proben	100% (129/129)	97,42% (151/155)
Negative Proben	-	2,6% (4/155)

2.2. Nachweis spezifischer Antikörper in verschiedenen Buchten

In allen Buchten in Betrieb A und Betrieb B konnten mittels ELISA spezifische Antikörper gegen Apx IV-I und OMP nachgewiesen werden. Eine Übersicht zu der S/P Ratio des Apx IV ELISA sowie den gemessenen Antikörpertiter gegen Apx III-I und OMP sind in Abbildung 13-18 dargestellt.

A) Betrieb A

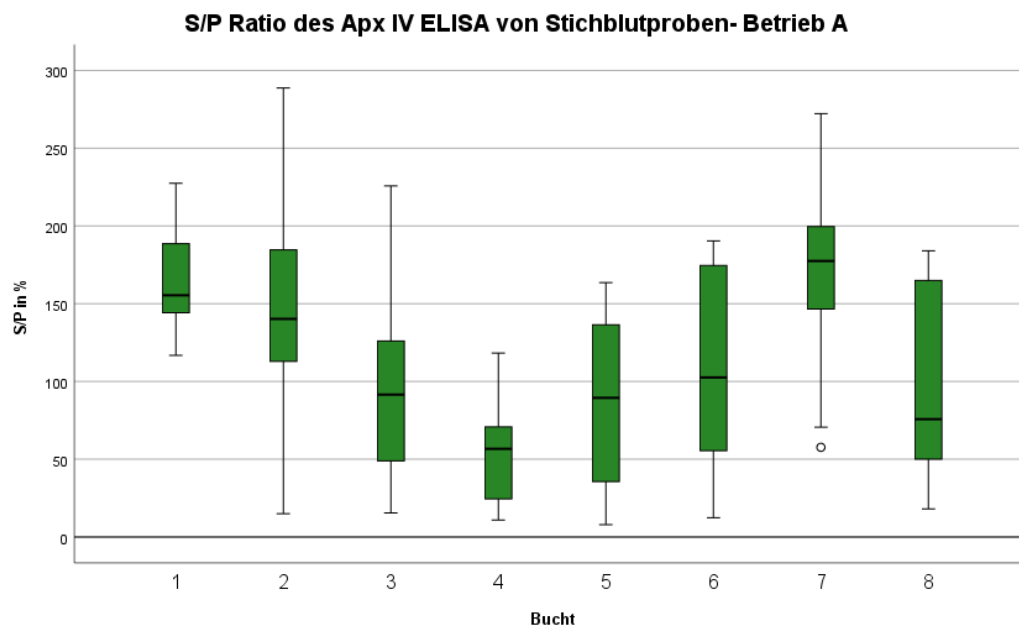


Abbildung 13: S/P Ratio % des Apx IV ELISA aus Stichblutproben von Schweinen pro Bucht in Betrieb A.

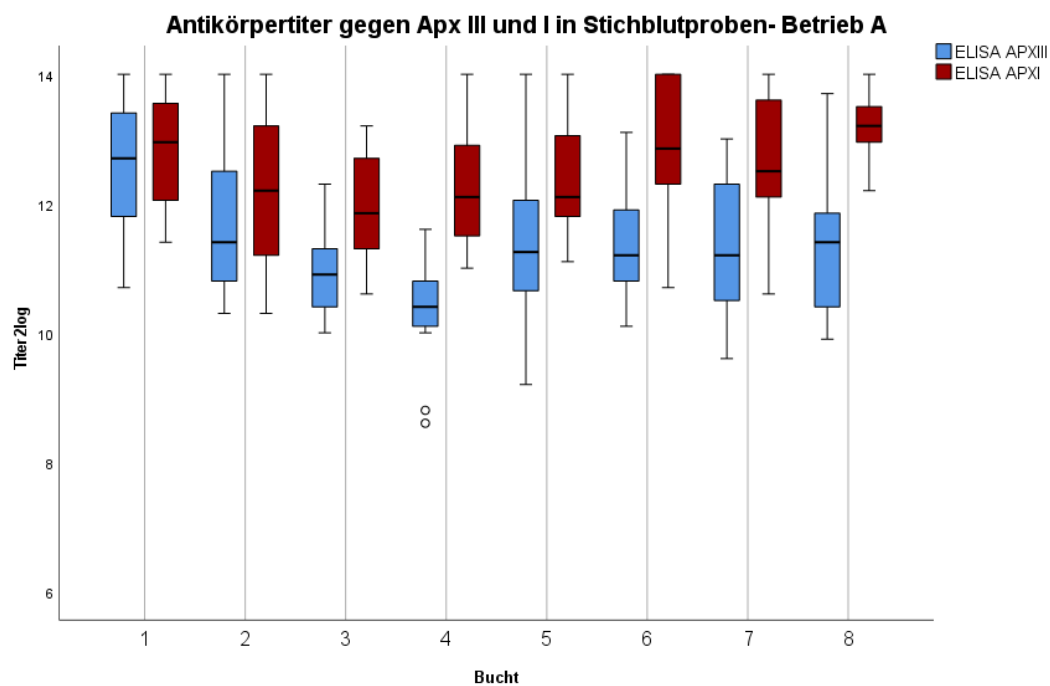


Abbildung 14: Antikörpertiter gegen Apx III und Apx I aus Stichblutproben pro Bucht in Betrieb A.

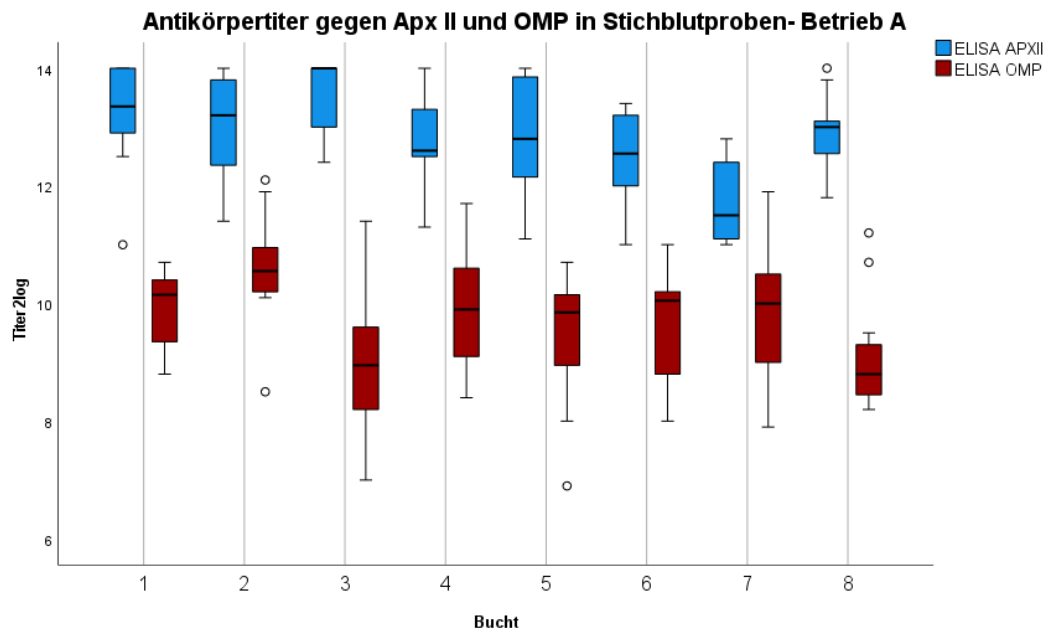


Abbildung 15: Antikörpertiter gegen Apx II und OMP aus Stichblutproben pro Bucht in Betrieb A.

B) Betrieb B

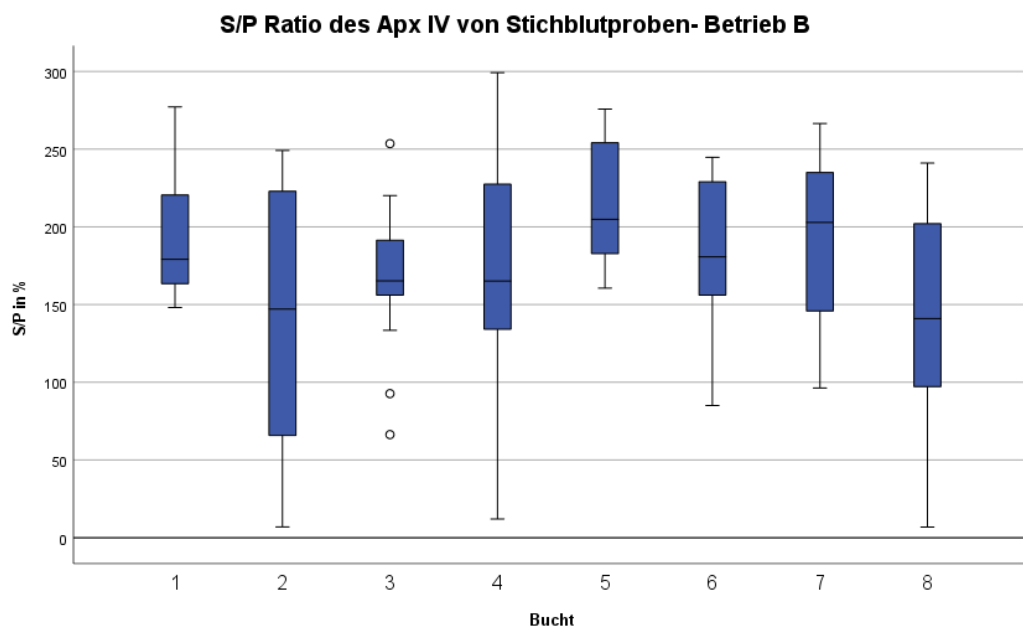


Abbildung 16: S/P Ratio % des Apx IV ELISA aus Stichblutproben pro Bucht in Betrieb B.

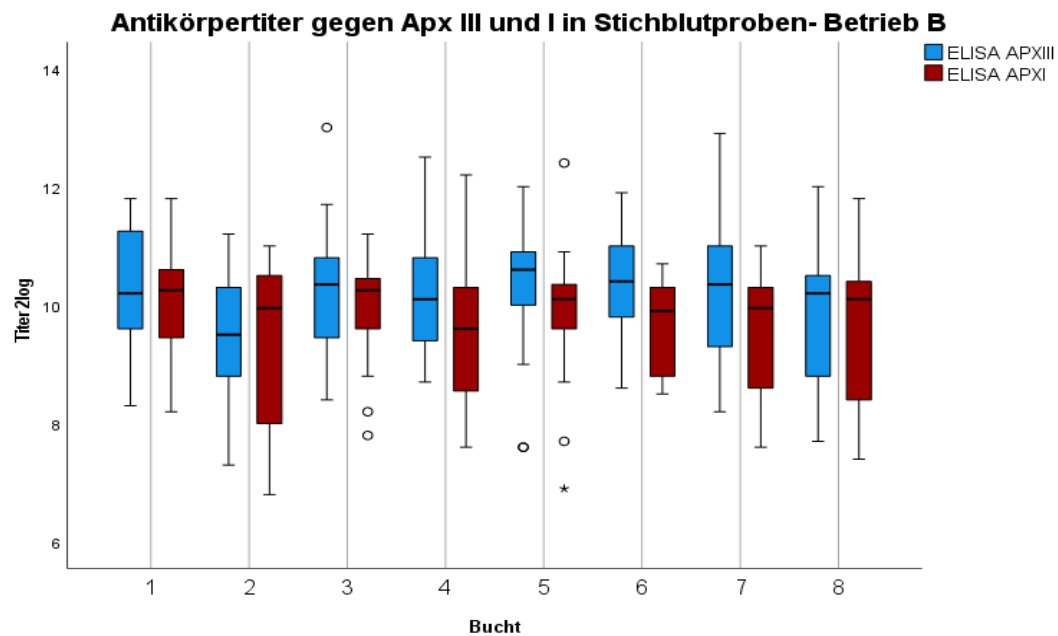


Abbildung 17: Antikörpertiter gegen Apx III und Apx I aus Stichblutproben pro Bucht in Betrieb B.

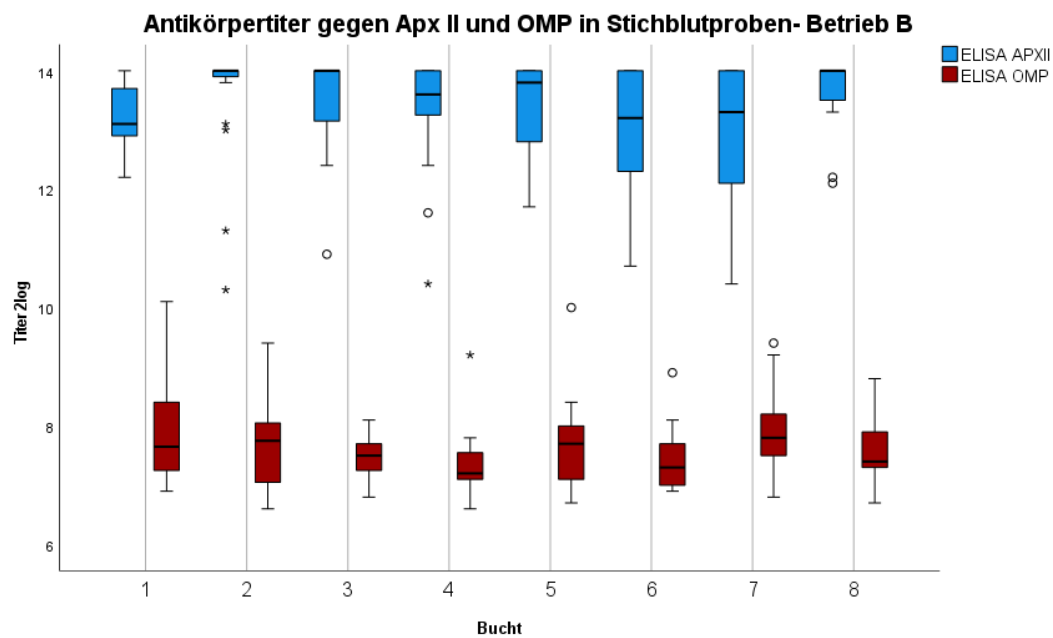


Abbildung 18: Antikörpertiter gegen Apx II und OMP aus Stichblutproben pro Bucht in Betrieb B.

3. Ergebnisse Lungenbeurteilung

Am Schlachtband wurden von Schweinen aus Betrieb A 167 Lungen nach dem SPES (DOTTORI et al., 2007) und Madec Score-System (MADEC & KOBISCH, 1982) beurteilt. 149 dieser beurteilten Lungen konnten eindeutig den Tieren unterschiedlicher Buchten zugeordnet werden. Aus Betrieb B wurden von 183 Schweinen die Lungen bewertet, wovon 179 beurteilte Lungen eindeutig den Tieren unterschiedlicher Bucht zuzuordnen sind. Weitere Details zu der Anzahl der Tiere aus den verschiedenen Buchten, deren Lungen am Schlachtband beurteilt wurden, können Tabelle 11 entnommen werden.

Tabelle 11: Anzahl beurteilter Lungen während der Schlachttierkörper-Untersuchung von Tieren aus Betrieb A und Betrieb B. Differenziert nach Buchten und einer Bucht nicht zuordenbare Lungen. Relativer Anteil (%) an gescorten Lungen von den insgesamt geschlachteten Tieren (n) pro Betrieb.

	Bucht								Nicht zuordenbar	Gesamt beurteilt	Gesamt geschlacht et	Anteil beurteilt
	1	2	3	4	5	6	7	8				
Betrieb A	21	22	18	19	20	15	18	16	18	167	183	91,3%
Betrieb B	21	21	22	24	21	22	25	22	5	183	215	85,1%

3.1. Lungenbeurteilung nach dem Schlachthof Pleuritis Evaluations System

A) Betrieb A

Bei 7,2% (12/167) der beurteilten Lungen wurde eine Pleuritis festgestellt. Dabei handelt es sich in 58,3% (7/12) der Fälle um kraniale Pleuritiden vom Grad SPES 1 und in 41,7% (5/12) der Fälle um dorso-kraniale Pleuritiden vom Grad $\text{SPES} \geq 2$. Die SPES Scores der einzelnen Buchten sind vergleichend in Abbildung 19 und in den Tabellen 12 und 13 dargestellt.

B) Betrieb B

Eine Pleuritis wurde bei 7,7% (14/183) der beurteilten Lungen vorgefunden. Es handelte sich dabei in 64,3% (9/14) der Fälle um eine kraniale Pleuritis vom Grad SPES 1 und in 35,7% (5/14) der Pleuritiden um eine dorso-kraniale Pleuritis vom Grad $\text{SPES} \geq 2$. Eine Darstellung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 19 sowie in den Tabellen 12 und 13 enthalten.

Tabelle 12: Absolute (n) und relative (%) Anzahl an Pleuritiden der beurteilten Lungen von Schweinen aus Betrieb A und Betrieb B.

	Betrieb A		Betrieb B	
	%	n	%	n
Lungen gesamt	100%	167	100%	183
Pleuritis gesamt	7,2%	12	7,7%	14
Pleuritis Grad SPES 1	4,2%	7	4,9%	9
Pleuritis Grad SPES 2	0,6%	1	1,6%	3
Pleuritis Grad SPES 3	0,6%	1	0,5%	2
Pleuritis Grad SPES 4	1,8%	3	0,5%	2

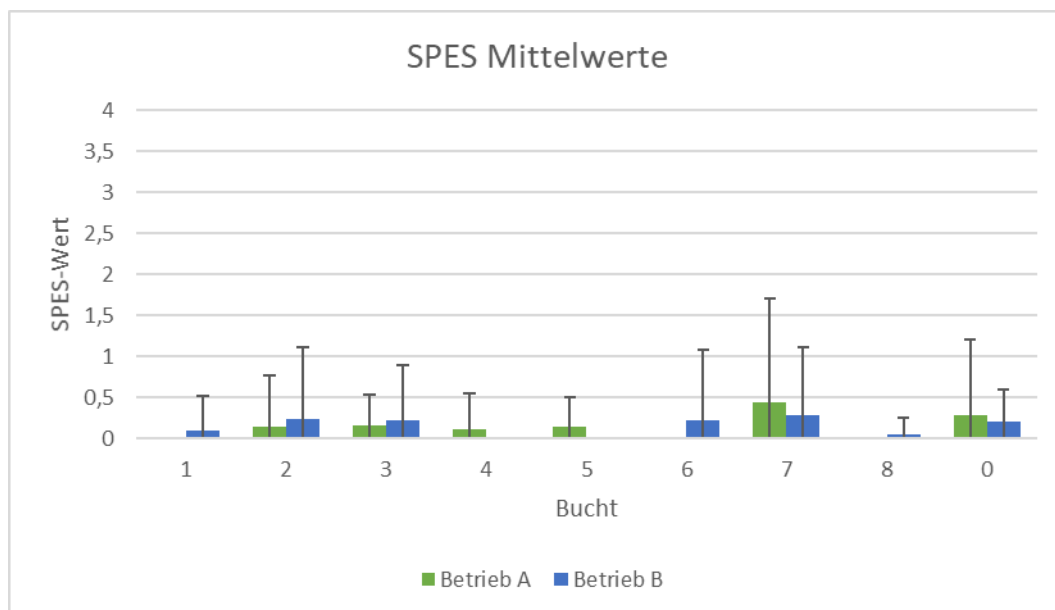


Abbildung 19: Mittlerer SPES-Score und Standardabweichung für beurteilte Lungen von Tieren aus den verschiedenen Buchten aus Betrieb A und Betrieb B. (Bucht 0 - konnte keiner Bucht eindeutig zugeordnet werden).

Tabelle 13: Verteilung der SPES Score Werte der beurteilten Lungen in den einzelnen Buchten für Betrieb A und Betrieb B.

		Bucht								Nicht zuordenbar
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Betrieb A	Pleuritis Grad SPES 0	21	21	15	18	17	15	16	16	16
	Pleuritis Grad SPES 1			3		3				1
	Pleuritis Grad SPES 2				1					
	Pleuritis Grad SPES 3		1							
	Pleuritis Grad SPES 4							2		1
Betrieb B	Pleuritis Grad SPES 0	20	19	19	24	21	20	21	21	4
	Pleuritis Grad SPES 1		1	2			1	3	1	1
	Pleuritis Grad SPES 2		1							
	Pleuritis Grad SPES 3				1					
	Pleuritis Grad SPES 4			1			1	1		

3.2. Lungenbeurteilung nach dem Madec Score

A) Betrieb A

Von den 167 untersuchten Lungen konnten 166 (99,4%) nach dem Madec Score bewertet werden. Die Lungen aus Betrieb A besaßen im Mittel einen Madec Score von 2,3 (Minimum (Min.): 0, Maximum (Max.): 14, Standardabweichung (SD): 2,9). Bei 65% der evaluierten Lungen war der Madec Score ≥ 1 . Weitere Details sind in Abbildung 20 aufgeführt. Unterschiedliche Ausprägungen des Madec Scores zwischen Tieren aus verschiedenen Buchten sind in Abbildung 21 dargestellt.

B) Betrieb B

Bei 180 der 183 (98,4%) untersuchten Lungen konnte ein Madec Score bestimmt werden. Die gescorten Lungen aus dem Betrieb B hatten im Mittel einen Madec Score von 2,2 (Min.: 0, Max.: 12, SD: 2,39). Ein Madec Score von ≥ 1 war bei 75% der Lungen vorzufinden. Weitere Details sind in Abbildung 20 dargestellt. In Abbildung 21 ist der Madec Score den Tiergruppen aus Betrieb B zugeordnet.

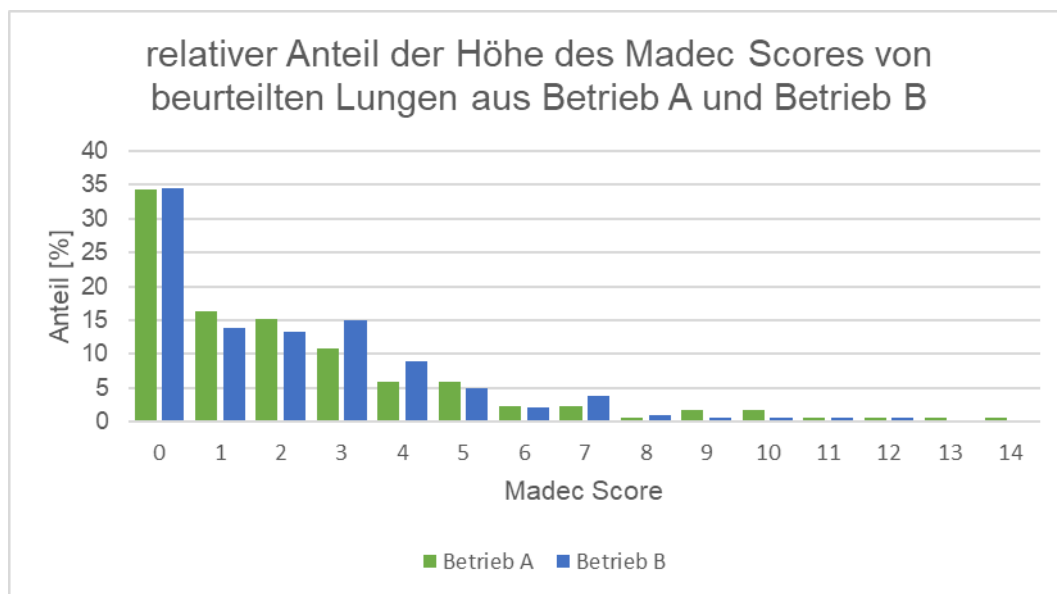


Abbildung 20: relativer Anteil (%) der Höhe des Madec Scores der beurteilten Lungen von Schweinen aus Betrieb A und Betrieb B.

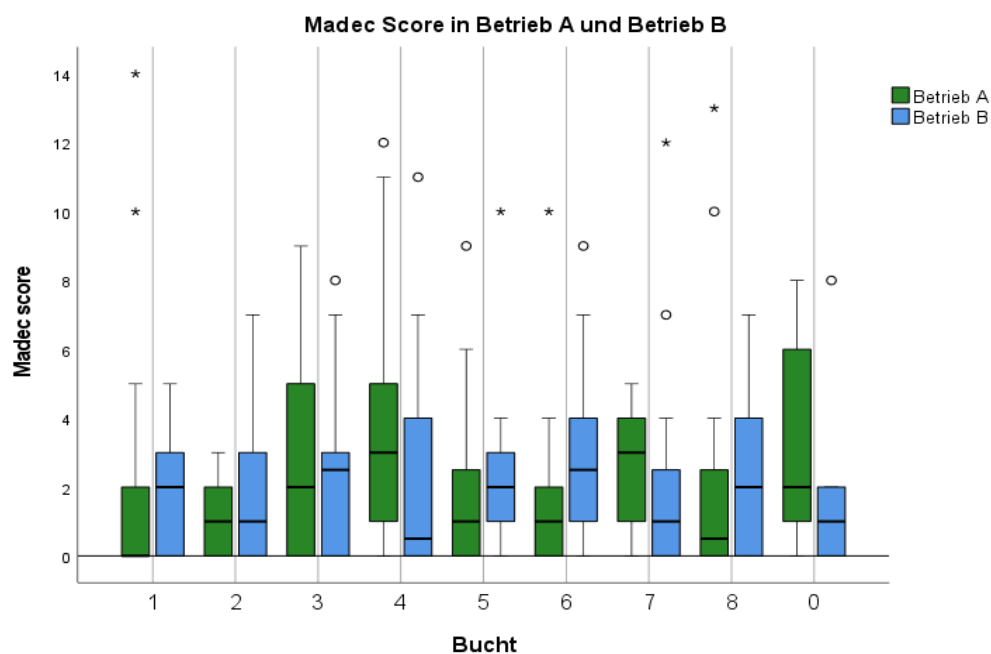


Abbildung 21: Madec Score der beurteilten Lungen von Tieren aus Betrieb A und Betrieb B aufgeteilt nach verschiedenen Buchten.

(Bucht 0 - konnte keiner Bucht zugeordnet werden).

4. Mastdauer

A) Betrieb A

Die mittlere Mastdauer aller Schweine aus Betrieb A betrug 115,4 Tage (Min.: 105 Tage, Max.: 149 Tage, SD: 10,1 Tage). Die mittleren Mastdauern der Schweine aus den verschiedenen Buchten können Abbildung 22 entnommen werden.

B) Betrieb B

Die Schweine aus Betrieb B hatten eine mittlere Mastdauer von 100,3 Tagen (Min.: 86 Tage, Max.: 114 Tage, SD: 9,19 Tage). Details zu den einzelnen Buchten sind in Abbildung 22 aufgeführt.

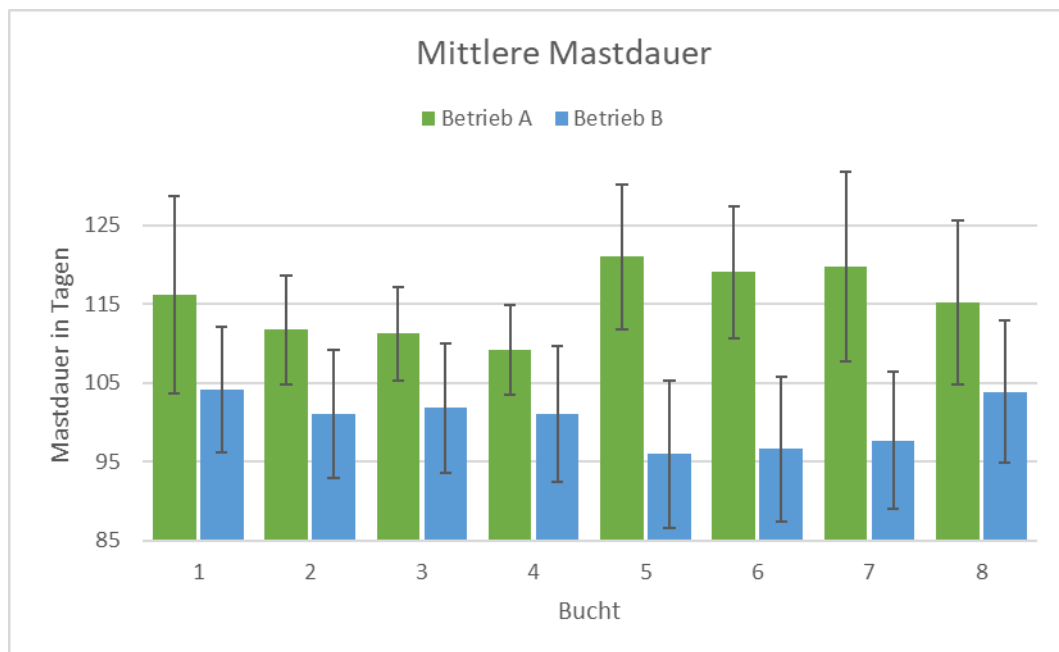


Abbildung 22: Mittlere Mastdauer von Schweinen aus Betrieb A und Betrieb B in verschiedenen Buchten und deren Standardabweichung.

5. Übereinstimmung der verschiedenen verwendeten Methoden der APP-Diagnostik

Im Folgenden wird die methodologische Übereinstimmung zwischen dem Nachweis von Apx IV, III und I DNA in OFS und dem Nachweis von Antikörpern gegen das entsprechende Apx-Toxin für Betrieb A und Betrieb B in verschiedenen Buchten dargestellt. Eine Bucht wird für den Apx-Nachweis als positiv gewertet, sofern einmalig Antikörper gegen das jeweilige Apx-Toxin in einer Stichblutprobe oder Apx-DNA in OFS nachgewiesen wurde. In Abbildung 23 ist das Maß der Übereinstimmung qualitativ dargestellt.

		Apx IV		Apx III		Apx I	
Bucht		Antikörper	DNA	Antikörper	DNA	Antikörper	DNA
Betrieb A	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
Betrieb B	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						

Apx-Nachweis	positiv	negativ
Apx IV		
Apx III		
Apx I		

Abbildung 23: Qualitative Übereinstimmung des Nachweises von Apx-DNA in OFS und von Antikörpern gegen das jeweilige Apx-Toxin für verschiedene Buchten in Betrieb A und Betrieb B.

6. Statistische Auswertung

6.1. Zusammenhang zwischen Apx-DNA in oral fluid samples und dem Ergebnis des Schlachthof Pleuritis Evaluations System

Mittels Korrelation nach Spearman wurde untersucht, ob die gesamt gemessenen Apx IV, III und I (exkl. Apx I in Betrieb B) DNA-Mengen in OFS aus verschiedenen Buchten und die Höhe des SPES Scores bei den am Schlachtband beurteilten Lungen von Schweinen aus Betrieb A und Betrieb B miteinander korrelieren. Dabei konnte keine Korrelation zwischen der gesamt gemessenen Apx-DNA in OFS aus den verschiedenen Buchten und der Höhe des SPES Scores festgestellt werden.

Des Weiteren gibt es keine Assoziation zwischen der gesamt gemessenen Apx-DNA in OFS aus den verschiedenen Buchten und dem Vorkommen von pathologischen Veränderungen an beurteilten Lungen ($\text{SPES} > 0$) am Schlachtband.

6.2. Zusammenhang zwischen der in oral fluid samples nachgewiesenen Apx-DNA und Länge der Mastdauer

Im folgenden Abschnitt wird der Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Apx-DNA in OFS und der Länge der Mastdauer analysiert.

6.2.1. Zusammenhang zwischen der gemessenen Apx-DNA-Menge in oral fluid samples und der Länge der Mastdauer

Zwischen der Höhe der gesamt nachgewiesenen Apx IV DNA in OFS in verschiedenen Buchten und der Länge der Mastdauer von Tieren aus diesen Buchten besteht in Betrieb B eine signifikante Korrelation ($p < 0,01$; $r = 0,204$). Des Weiteren gab es eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der insgesamt detektierten Apx III DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten und der Länge der Mastdauer von Tieren aus diesen Buchten in Betrieb A ($p < 0,01$; $r = 0,284$) und Betrieb B ($p < 0,01$; $r = 0,248$). In Betrieb A bestand zwischen der gesamt gemessenen Apx I DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten und der Länge der Mastdauer von Tieren aus diesen Buchten eine signifikante Korrelation ($p < 0,01$; $r = 0,262$).

6.2.2. Assoziationen zwischen dem Nachweis von Apx-DNA in oral fluid samples aus positiven Buchten und der Länge der Mastdauer

Mittels Mann-Whitney-U-Test konnte in Betrieb B ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$) zwischen dem Nachweis von Apx III DNA in OFS und der Länge der mittleren Mastdauer ermittelt werden. Es zeigte sich, dass die mittlere Mastdauer von Tieren, die aus Buchten kamen, in denen APX III DNA in OFS detektiert wurde (102,39 Tage, Min. 86 Tage, Max. 114 Tage, SD 9,12 Tage), signifikant über der mittleren Mastdauer von Tieren lag, die aus Buchten stammten, in denen über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Apx III DNA in OFS nachgewiesen wurde (96,76 Tage, Min. 86 Tage, Max. 114 Tage, SD 8,57 Tage). Der Unterschied der mittleren Mastdauer zwischen den beiden Gruppen betrug 5,6 Tage und ist graphisch in Abbildung 23 dargestellt.

Weitere Assoziationen wurden nicht durchgeführt, da in beiden Betrieben der Apx-Toxin Nachweis einheitlich in allen Buchten möglich war bzw. nicht möglich war.

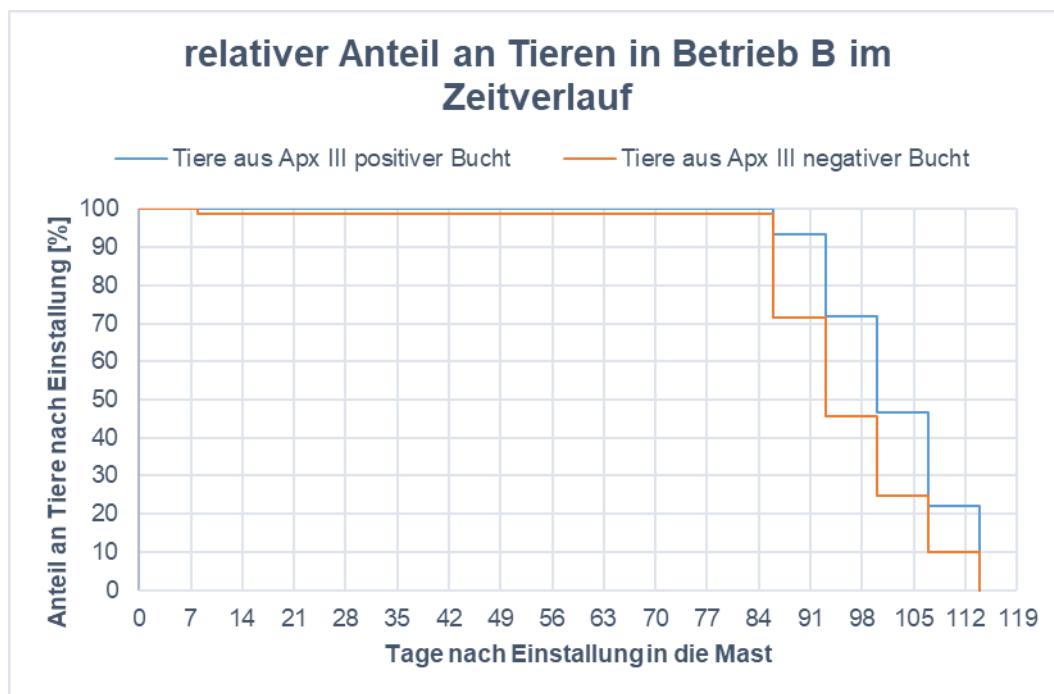


Abbildung 24: Veränderung der relativen Tieranzahl über die gesamte Mastdauer in Betrieb B. Einteilung in Tiere, die aus Apx III DNA in OFS negativen Buchten stammen und Tiere, die aus Apx III DNA in OFS positiven Buchten stammen.

6.3. Zusammenhang zwischen den Lungenscores und der Mastdauer

Festgestellte Zusammenhänge zwischen der Höhe des Lungenscores (SPES und Madec Score) und der Länge der Mastdauer werden im Folgenden dargestellt.

Mit Hilfe des Spearman-Rho Tests wurde festgestellt, dass die Höhe des Madec Scores bei beurteilten Lungen von Schweinen aus Betrieb B signifikant ($p < 0,05$, $r = 0,194$) mit der Mastdauer korreliert. Es zeigte sich, dass je höher der Madec Score war, desto länger war die Mastdauer in Betrieb B.

Weitere Zusammenhänge zwischen dem Madec oder SPES Score und Mastdauer konnten in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden.

V. DISKUSSION

1. Apx IV DNA-Nachweis in oral fluid samples

Der direkte APP-Nachweis ist bisher durch aufwendige invasive Methoden wie Nasentupfer, BALF oder Tonsillenkratzproben am lebenden Tier möglich (SAVOYE et al., 2000; TOBIAS et al., 2012). In der vorliegenden Studie gelang es, Apx IV DNA unter Felddbedingungen in zwei konventionellen Mastbetrieben in OFS nachzuweisen. Es handelt sich hierbei um einen speziesspezifischen APP-Nachweis, da das Toxin ausschließlich von APP in vivo gebildet wird (SCHALLER et al., 1999). Der APP-Nachweis in OFS mittels einer PCR gelang bereits in vorherigen Studien sowohl unter experimentellen Bedingungen (COSTA et al., 2012; DRON et al., 2012) als auch unter Felddbedingungen (CHEONG et al., 2017). Das für die vorliegende Studie geltende Einschlusskriterium der Versuchsbetriebe war, dass APP in vorherigen Mastdurchgängen bereits nachgewiesen wurde. Aus diesem Grund war zu erwarten, dass in beiden Betrieben Apx IV DNA nachgewiesen wird.

In der vorliegenden Studie konnten in Betrieb A in 91,7% (199/217) und in Betrieb B in 96,5% (222/230) der untersuchten OFS Apx IV DNA nachgewiesen werden. Die Nachweisrate von APP-DNA in OFS ist in der vorliegenden Arbeit deutlich höher als bei experimentell infizierten Tieren (COSTA et al., 2012), denn bei diesen wurde lediglich in 6,1% (3/49) der untersuchten OFS APP-DNA detektiert. Des Weiteren gelang in einer koreanischen Querschnittsstudie unter Felddbedingungen der APP-DNA-Nachweis bei 24,8% (53/214) der beprobten OFS (CHEONG et al., 2017). Der APP-Nachweis war darüber hinaus in einer bekanntermaßen mit APP ST 1 und 7 subklinisch infizierten australischen Herde möglich. Im Rahmen dieser Studie wurde bei 4% (1/25) der von Einzeltieren gewonnen OFS APP-DNA detektiert (DRON et al., 2012). Allerdings vermuten die Autoren, dass es sich bei dieser Detektion um eine Kontamination handelt, da bei diesem Tier weder in einer Tonsillenkratzprobe APP-DNA nachgewiesen wurde, noch in einer Blutprobe Antikörper gegen Apx IV detektiert wurden.

Die Anwesenheit unterschiedlicher APP ST bei den untersuchten Schweinen könnte einen Einfluss auf die Nachweisrate von APP-DNA in OFS haben und mitverantwortlich für die wesentlich höheren Nachweisraten von APP-DNA in OFS in der vorliegenden Studie, verglichen mit den oben genannten Studien,

sein. In der Literatur sind verschiedene Ortsspezifitäten für unterschiedliche APP ST beschrieben (BÉLANGER et al., 1990). Daher wäre es möglich, dass sich die APP-DNA der verschiedenen APP ST nicht gleichermaßen gut in den OFS nachweisen lassen. Dies könnte ursächlich für die unterschiedlich hohen Nachweisraten von APP-DNA in OFS sein.

Die im Vorfeld der eigenen Studie nachgewiesenen APP ST sind diesbezüglich von besonderem Interesse. In Betrieb A wurden die APP ST 1, 9 und 11 und in Betrieb B die APP ST 3, 6, 8 und 7 nachgewiesen. Es ist somit anzunehmen, dass die in der australischen Studie im Vorhinein festgestellten APP ST 1 und 7 durch die in der vorliegenden Studie vorkommenden APP ST vertreten waren. Mit der hier dargestellten Untersuchung gelang im Gegensatz zur australischen Studie in beiden Betrieben der Nachweis von APP-DNA in über 90% der OFS. Auch bei den experimentell infizierten Tieren von COSTA et al. (2012) gelang der APP-DNA-Nachweis in OFS bei Tieren, die mit den APP ST 3, 7 und 10 infiziert waren. Hingegen war der Nachweis von APP-DNA in OFS bei Tieren, die mit den APP ST 1 und 15 infiziert waren, nicht möglich (COSTA et al., 2012).

Welche APP ST in der australischen und in der vorliegenden Studie zum Zeitpunkt der Probengewinnung tatsächlich nachgewiesen wurden, ist nicht bekannt (DRON et al., 2012). Es ist jedoch zu beachten, dass es sich bei der vorliegenden Studie um eine Feldstudie in konventionellen Mastbetrieben handelt. Häufig kommen mehrere APP ST gleichzeitig in Mastbeständen vor (GOTTSCALK, 2019). Anhand des nachgewiesenen Apx-Toxin-Musters in Betrieb A (Apx IV, III und I) und in Betrieb B (Apx IV, III) ist anzunehmen, dass auch weitere APP ST in Betrieb A vorkommen, da die APP ST 1, 9 und 11 das Toxin-Muster Apx IV, II und I besitzen (BECK et al., 1994). In Betrieb B wird hingegen von den APP ST 3, 6 und 8 das Toxin-Muster Apx IV, III und II und von dem APP ST 7 das Toxin-Muster Apx IV und II sezerniert und passt somit mit dem in den OFS nachgewiesenen Apx-Toxin-Muster überein. Alternativ wäre es indes möglich, dass andere Bakterien die Apx III oder Apx I Toxine sezernieren. Anhand des Apx-Toxin-Musters ist es nicht möglich, das exakte Vorkommen der APP ST in einem Bestand zu identifizieren (BECK et al., 1994; SCHALLER et al., 2000; KUHNERT et al., 2005).

Falls sich einige APP ST nur schlecht oder gar nicht in OFS nachweisen lassen, hätte dies zur Folge, dass Monitoringprogramme und Screenings mittels des

Nachweises von APP-DNA in OFS nur eingeschränkt möglich sind. Die Herleitung verlässlicher Aussagen über den Einfluss der APP ST auf die Nachweisrate von APP-DNA in OFS bleibt künftigen Forschungsarbeiten vorbehalten.

Die verwendete Methodik zur Führung des Nachweises von APP-DNA in OFS hat einen möglichen Einfluss auf die Nachweisrate von APP-DNA in OFS. In der vorliegenden Studie wurde eine für OFS validierte, konventionell erhältliche qPCR, basierend auf dem FAM Channel des Apx IV Toxin, genutzt. Sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität werden vom Hersteller mit mehr als 99% angegeben (vgl. XI.3.). Hingegen wurde sowohl in der australischen als auch in der koreanischen Studie eine omlA PCR mit einem Primer, der auf eine Gensequenz des omlA zielt, verwendet (GRAM & AHRENS, 1998; DRON et al., 2012; CHEONG et al., 2017). Bei den experimentell infizierten Tieren von COSTA et al. (2012) wurde eine PCR des „Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratory“ genutzt, welche nicht weiter beschrieben ist.

In einer vergleichenden Studie wurde die Sensitivität für eine Apx IV PCR und für eine omlA PCR bei Tonsillenkratzproben bestimmt. Dies ist von besonderem Interesse, da eine Apx IV PCR in der vorliegenden Studie und eine omlA PCR in anderen Studien verwendet wurde. In diesen Studien fielen die APP-DNA-Nachweisraten in OFS deutlich niedriger aus als in der vorliegenden Studie. Die Nachweisgrenze von APP liegt bei der Apx IV PCR mit $3,6 \times 10^2$ koloniebildende Einheiten (KbE)/g Tonsille über der Sensitivität der omlA PCR mit 4×10^4 KbE/g Tonsille. Die Spezifität wird für beide PCRs mit 100% beschrieben (FITTIPALDI et al., 2003). Die genannte Studie zeigt, dass die Sensitivität einer Apx IV PCR höher ist als die einer omlA PCR. Darüber hinaus wurde die Nachweisgrenze von APP in OFS mittels einer omlA PCR bestimmt. Dabei konnte die APP-Konzentration von $1,26 \times 10^4$ KbE/ml in reinen OFS und $1,26 \times 10^3$ KbE/ml in OFS, die mit einem Verdünnungsmittel homogenisiert wurden, detektiert werden (DRON et al., 2012). Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Apx IV DNA-Nachweis in Tonsillenkratzproben bei experimentell infizierten Tieren bei 98,2% (56/57) liegt. Eine ebenfalls hohe Nachweisrate von 95,5% (42/44) wurde bei denselben Tieren mit Nasentupfern erreicht (TOBIAS et al., 2012). Bei einem Vergleich mit den Nachweisraten der OFS in der vorliegenden Studie ist zu beachten, dass es sich bei den Tonsillenkratzproben und den Nasentupfern um Einzeltierproben handelt.

Anhand der vorliegenden Studie kann nicht bewertet werden, wie hoch die Sensitivität und Spezifität der OFS für Apx IV DNA sind, da es keine dahingehenden Referenzwerte gibt, ob die Tiere zu dem jeweiligen Untersuchungszeitpunkt Apx-DNA sezerniert haben.

Der Gebrauch von unterschiedlichen PCR Kits hat möglicherweise einen Einfluss auf die Nachweisrate der APP-DNA von OFS. Dieser Sachverhalt müsste in einer vergleichenden Studie für die verschiedenen PCR Kits im Vergleich zu Tonsillenkraatzproben analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde indes eine hohe Nachweisrate von Apx IV DNA mittels einer Apx IV qPCR erreicht, die sich für den Apx IV DNA-Nachweis in OFS eignet und daher unter Feldbedingungen verwendet werden kann.

Der früheste bisher beschriebene Nachweis von APP-DNA in OFS gelang bei experimentell mit dem APP ST 3 infizierten Tieren einen Tag p. inf. (COSTA et al., 2012). In der vorliegenden Studie war der Nachweis von Apx IV DNA in OFS in Betrieb A und in Betrieb B am Tag der Einstellung bereits in allen Buchten möglich. Der Apx IV DNA-Nachweis in OFS gelang, außer an drei Untersuchungszeitpunkten, dauerhaft in allen Buchten. Zu diesen drei Zeitpunkten wurde in Betrieb A jeweils in einer Bucht keine Apx IV DNA nachgewiesen. Bemerkenswert ist, dass in Betrieb B zu jedem Zeitpunkt der Probengewinnung in jeder Bucht Apx IV DNA nachgewiesen wurde. Dahingegen gelang der Nachweis von APP-DNA in OFS bei den experimentell infizierten Tieren von COSTA et al. (2012) lediglich in drei verschiedenen Tiergruppen jeweils nur einmal, obwohl in dem Versuch ein wöchentliches Intervall zur Probengewinnung gewählt wurde (COSTA et al., 2012). Des Weiteren wurde in einer Querschnittsstudie von 56 Betrieben in vier verschiedenen Altersgruppen in lediglich 24,8% der untersuchten OFS APP-DNA nachgewiesen (CHEONG et al., 2017).

In der vorliegenden Studie gab es eine engmaschige Probengewinnung. Zu jedem Zeitpunkt der Probengewinnung wurden sämtliche Buchten untersucht. Waren die Buchten in Betrieb A oder in Betrieb B mit mehr als 25 Tiere belegt, so wurden in diesen Fällen zwei OFS pro Bucht gewonnen. Bei der Analyse der OFS zeigte sich, dass Apx IV DNA in OFS zu einzelnen Untersuchungszeitpunkten in einzelnen Buchten nicht nachweisbar war. In Buchten, in denen zwei OFS zu einem Zeitpunkt der Probengewinnung gewonnen wurden, kam es vor, dass nur in einem der beiden OFS Apx IV DNA

detektiert wurde. Es ist bekannt, dass der Nachweis von APP ST nicht kontinuierlich möglich ist, daher wird empfohlen, eine Beprobung zu verschiedenen Zeitpunkten durchzuführen (CHIERs et al., 2002b). So wurde es in der vorliegenden Studie gehandhabt. Zusätzlich konnte mit Hilfe der Untersuchung von Stichblutproben gezeigt werden, dass weder alle Tiere in Betrieb A (91,5%) noch in Betrieb B (94,2%) Antikörper gegen Apx IV aufwiesen. Diese Tiere waren entweder nicht infiziert oder zeigten auf Grund einer fehlenden Lungenbesiedlung keine Serokonversion (CHIERs et al., 2002b). Dass sich nicht alle Tiere mit APP infizieren oder es zumindest zu keiner Serokonversion mit Antikörpern gegen Apx IV kommt, ist bekannt (MEYNS et al., 2011; MERIALDI et al., 2012; TOBIAS et al., 2014). Hinzu kommt, dass dominante Tiere längere Zeit die Kaustricke manipulieren, wohingegen weniger dominante, kranke bzw. apathische Tiere einen geringeren Antrieb aufweisen, Kontakt mit einem oder sogar beiden Kaustricken aufzunehmen. Daher besteht die Gefahr, diese Tiere in der Probe nicht zu erfassen (DRON et al., 2012). Es bleibt festzuhalten, dass nicht alle Tiere in der Zeit von 25 Minuten mit beiden Kaustricken interagieren und deshalb nicht bei allen Tieren dauerhaft APP nachgewiesen werden kann. Des Weiteren waren wahrscheinlich nicht alle Tiere mit APP infiziert. Diese Tatsachen scheinen für das Phänomen verantwortlich zu sein, dass nur in einem von zwei OFS aus derselben Bucht zum selben Zeitpunkt der Probengewinnung Apx IV DNA nachgewiesen wurde (CHIERs et al., 2002b; MEYNS et al., 2011; COSTA et al., 2012; DRON et al., 2012; TOBIAS et al., 2014). Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass es sich um falsch-negative Apx IV Ergebnisse handelt, da die Sensitivität von mehr als 99% einen kleinen, aber dennoch möglichen Fehleranteil zulässt (vgl. XI.3.; CANNON, 1982).

Der Nachweis von Apx IV DNA in OFS war in der vorliegenden Studie nahezu durchgehend in den verschiedenen Buchten möglich und eignet sich daher für Monitoringprogramme und Screenings. Auf Grund dessen weist eine engmaschige Probengewinnung von OFS für den Apx IV DNA-Nachweis keine nennenswerten Vorteile gegenüber einer einmaligen Beprobung auf. Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse würde dementsprechend die einmalige Beprobung einer gesamten Tiergruppe ausreichen, um ein aussagekräftiges Ergebnis darüber zu erhalten, ob die Tiere eines Bestandes mit APP infiziert sind.

2. Apx III und I DNA-Nachweis in oral fluid samples

In der vorliegenden Studie wurden die OFS neben Apx IV auf die Toxine Apx III und I getestet. Das Apx II Toxin wurde nicht berücksichtigt, da es in der verwendeten, für OFS validierten und konventionell erhältlichen APP qPCR nicht integriert war.

Der Nachweis von Apx III DNA in OFS gelang in Betrieb A bei 47,9% (104/217) und in Betrieb B bei 38,3% (88/230) der untersuchten OFS. Apx I DNA in OFS konnte in Betrieb A bei 19,4% (42/217) der analysierten OFS detektiert werden. In keiner bisher bekannten Feldstudie wurde der Apx III und I DNA-Nachweis in OFS erbracht.

Interessant ist der Nachweis der weiteren Apx-Toxine neben Apx IV, da die Expression der Apx-Toxine der maßgebliche Einflussfaktor auf die Pathogenität der APP ST ist (BOSSÉ et al., 2002). Das Apx-Genprofil kann als Indikator für den Grad der Virulenz eines jeweiligen APP ST verwendet werden (BECK et al., 1994). Apx III besitzt keine haemolytischen, dafür jedoch stark zytotoxische Eigenschaften. Apx II wird als moderat virulent mit schwach haemolytischen und mäßig zytotoxischen Eigenschaften beschrieben. Apx I hingegen gilt als hoch virulent mit stark haemolytischen und zytotoxischen Eigenschaften (KAMP et al., 1991; FREY et al., 1993; KAMP et al., 1997).

Der Nachweis von Apx III DNA in OFS gelang in beiden Betrieben bereits am Tag der Einstellung und war danach kontinuierlich bei jeder Probengewinnung in mindestens einer Bucht möglich.

Apx I DNA wurde ausschließlich in Betrieb A detektiert. Das Vorhandensein von Apx I DNA in OFS wurde ebenfalls bereits an dem Tag der Einstellung nachgewiesen, jedoch wurde das Toxin in OFS nicht dauerhaft identifiziert.

In der vorliegenden Studie ließ sich Apx III und Apx I DNA in OFS nicht permanent in den einzelnen Buchten detektieren. Die Untersuchungen von zwei OFS derselben Bucht, die zum selben Zeitpunkt genommen wurden, weisen häufig unterschiedliche Ergebnisse auf. Die Ursache dieses Phänomens ist darauf zurückzuführen, dass einerseits die Tiere nicht konstant Apx-Toxine sezernieren und ist andererseits im Explorationsverhalten der einzelnen Tiere begründet (CHIERS et al., 2002b; DRON et al., 2012). Dieser Zusammenhang wird in Kapitel V.1. „Apx IV DNA-Nachweis in oral fluid samples“ genauer beschrieben.

In Betrieb B wird über den gesamten Zeitraum der Probengewinnung in drei Buchten keine Apx III DNA in OFS nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass kein Tier aus diesen Buchten das Toxin sezerniert hat. Andererseits ist es möglich, dass Apx III DNA in OFS in diesen Buchten zwar vorkam, aber nicht bei der Probengewinnung detektiert wurde, da es genau zu diesen Zeitpunkten nicht vorhanden war (CHIERs et al., 2002b; DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014). Dem ist entgegen zuhalten, dass das Beprobungsintervall in der vorliegenden Studie engmaschig gewählt wurde und darüber hinaus der Stichprobenumfang hoch war (CANNON, 1982). In allen anderen Buchten in Betrieb A und Betrieb B ließ sich Apx III DNA in OFS nachweisen. Des Weiteren gelang in den drei eingangs dieses Abschnitts angesprochenen Buchten dauerhaft der Nachweis von Apx IV DNA in OFS. Dass die Spezifität der Apx III PCR zu niedrig ist und daher die Apx III DNA in diesen Buchten nicht richtig erkannt wurde, ist unwahrscheinlich, da in Betrieb A und in den anderen fünf Buchten des Betriebs B der Nachweis von Apx III DNA in OFS erbracht werden konnte. Ebenfalls erscheint es unwahrscheinlich, dass die Spezifität der Apx III PCR zu niedrig ist, da sich bei der Validierung der Apx III PCR für OFS sowohl eine Sensitivität als auch eine Spezifität von mehr als 99% ergeben hat (vgl. XI.3.). Bereits in vorherigen Studien konnte mittels einer multiplex PCR (APX III-I) zur APP ST Differenzierung in 96% der Fälle das richtige Apx-Toxin-Muster von Tonsillenkratzen identifiziert werden (GRAM et al., 2000).

In allen Stichblutproben konnten von Tieren, die aus den drei oben genannten Buchten stammten und in denen keine Apx III DNA in OFS nachgewiesen wurde, Antikörper gegen Apx III detektiert werden. Diese Antikörpergehalte aus Stichblutproben gegen Apx III erscheinen nicht schlüssig und könnten falsch-positive Ergebnisse sein. Ein Antikörpernachweis in 100% der Stichblutproben würde bedeuten, dass der Nachweis von Apx III DNA in den OFS zu den Zeitpunkten der Probengewinnung in den drei Buchten nicht gelang. Es waren somit die falschen Zeitpunkte der Probengewinnung oder die Antikörper gegen Apx III stammen aus dem Zeitraum vor Beginn des Versuches (CRUIJSEN et al., 1995; CHIERs et al., 2002b; COSTA et al., 2012; GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2014). Es wäre unter den gegebenen Feldbedingungen durchaus möglich, dass es sich um Kreuzreaktionen zu Toxinen von anderen RTX-toxinbildenden, gramnegativen Bakterien handelt (DEVENISH et al., 1989). Bei den nachgewiesenen Antikörpern gegen Apx III in den Stichblutproben der

Endmastschweine ist es nicht möglich, dass es sich noch um maternale Antikörper handelt, da bei Endmastschweinen ohne Kontakt zu einem Apx III Toxin keine Antikörper gegen Apx III detektiert werden können (GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2014). In einer anderen Studie wird die Seroprävalenz von Antikörpern gegen Apx III mit 17,5% beschrieben und die Spezifität für einen Apx III ELISA mit 96% angegeben (SHIN et al., 2011). Wieder andere Studien zeigen Kreuzreaktionen zwischen den Apx III, II und I Toxinen und weisen Seroprävalenzen von Antikörpern gegen Apx III mit bis zu 100% nach (GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2014). Dies ist möglicherweise auch der Grund für den hohen Antikörpernachweis gegen Apx III in den Stichblutproben in der vorliegenden Arbeit.

Der Nachweis von Apx III DNA in OFS mittels einer qPCR scheint spezifischer zu sein als der Nachweis von Antikörpern gegen Apx III mittels eines Inhouse-ELISA und eignet sich für die Apx III Detektion im Feld.

Die Vermutung liegt nahe, dass während des gesamten Versuchszeitraums in den Buchten 5-7 kein Apx III sezerniert wurde. Interessant bei dieser Annahme ist die Betrachtung der Lage dieser drei Apx III negativen Buchten. Sie werden durch einen circa einen Meter breiten Mittelgang von den gegenüberliegenden Buchten 2-4 getrennt, in denen Apx III DNA in OFS nachgewiesen wurde. Des Weiteren liegt die Apx III DNA positive Bucht 8 direkt neben der Bucht 7. Die Tiere aus diesen beiden Buchten werden über einen Trog in der Mitte gefüttert. Tieren aus den Buchten 7 und 8 ist es möglich, durch Teilabschnitte der Aufstallung direkten Kontakt zu einander herzustellen. Es scheint indes keine Übertragung zwischen den verschiedenen Buchten gegeben zu haben. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass es bei der Übertragungsrate von APP ST keinen Unterschied macht, ob sich die Tiere in benachbarten Buchten befinden oder aus weiter entfernten Buchten innerhalb eines Abteils stammen. Innerhalb einer Bucht ist das Ansteckungsrisiko hingegen um ein zehnfaches höher als zu den Tieren aus den Nachbarbuchten (TOBIAS et al., 2014). Von anderen Autoren wird eine Übertragung über die Luft für eine Entfernung von 1-2,5 Metern beschrieben, allerdings nur in Kombination mit hohen Ventilationsraten und milden klinischen Anzeichen (KRISTENSEN et al., 2004b). Die Tiere in Betrieb B zeigten keine klinischen respiratorischen Anzeichen, sodass ein vermehrter Ausstoß von kontagiösem Erregermaterial und damit eine erhöhte Transmissionsrate nicht gegeben war (TOBIAS et al., 2013).

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die Übertragungsrate zwischen Buchten minimal ist. Dies weist die hohe Relevanz von Biosicherheits- und Quarantänemaßnahmen hin. Von besonderer Bedeutung sind die Maßnahmen für Betriebe, die Tiere zukaufen.

Der Apx I DNA-Nachweis gelang ausschließlich in Betrieb A, vor allem bis zur Woche 5 nach der Einstallung. Danach konnte Apx I DNA in OFS nur noch sporadisch nachgewiesen werden. Eine subklinische Infektion zu Beginn der Mast kann durch Stress getriggert werden, welcher durch das Zusammenstallen von Tiergruppen oder den Transport verursacht werden kann (CHIERs et al., 2010; TOBIAS et al., 2014). Des Weiteren sind Tiere in dem Alter, welches sie bei der Umstallung in die Mast aufweisen am empfindlichsten für APP-Infektionen, da der maternale Antikörperspiegel bis zu diesem Alter abfällt (CRUIJSEN et al., 1995). Für dieses Alter werden auch in anderen Studien subklinische APP-Infektionen beschrieben (CRUIJSEN et al., 1995). Außerdem kann gezeigt werden, dass APP ST nur für einen kurzen Zeitraum nachweisbar sind (DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014), wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. Dass es trotz Vorhandenseins des hoch virulenten Apx I Toxins in Betrieb A (Apx III und I) zu keinem klinischen APP-Ausbruch gekommen ist, kann dadurch erklärt werden, dass der Ausbruch einer klinischen APP-Infektion ein multifaktorielles Geschehen darstellt, was weitere Trigger benötigt, die hier eventuell nicht stark genug ausgeprägt waren (TOBIAS et al., 2013; KLINKENBERG et al., 2014). Solche Trigger können infektiösen oder nichtinfektiösen Ursprungs sein (DUBREUIL et al., 2000; VAN DIXHOORN et al., 2016). Zu den nichtinfektiösen Risikofaktoren zählen neben dem Mischen von Tiergruppen und dem Transportstress weitere Stressoren wie Umwelteinflüsse, Platzmangel, negative klimatische Bedingungen und jahreszeitliche Einflüsse (ROSENDAL & MITCHELL, 1983; MAES et al., 2001; CHIERs et al., 2010; TOBIAS et al., 2014). Zu den infektiösen Einflüssen zählen Co-Infektionen mit anderen Atemwegserregern (MAROIS et al., 2009, NARITA et al., 1997; FABLET et al., 2012; NICKOLL, 2018). Da es sich in der vorliegenden Arbeit um eine Feldstudie handelt, wurde der Einfluss der Trigger auf die APP-Infektion nicht weiter analysiert.

Des Weiteren wurden die Tiere in Betrieb A zu Beginn der Mast mit einem APP-Impfstoff geimpft, was ebenfalls für das Ausbleiben einer klinischen APP-Infektion ursächlich sein könnte. Allerdings schützt die verwendete

Subunit-Vakzine nicht vor einer APP-Infektion, sie minimiert vielmehr lediglich die Letalität und die klinische Ausprägung (ŠATRÁN et al., 2003).

Andererseits sind die Apx-Toxine III und I nicht speziesspezifisch und können auch von anderen Bakterien stammen und somit nicht von einer subklinischen APP-Infektion. *A. suis* exprimiert beispielsweise den Genotypen apxICABD und *A. rossii* den Genotypen apxIIICABD (SCHALLER et al., 2000; KUHNERT et al., 2005). Zeitgleich wurde jedoch in dieser Studie Apx IV DNA detektiert, was APP speziesspezifisch ist und für eine subklinische APP-Infektion spricht (SCHALLER et al., 1999).

Unter Feldbedingungen kann die Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von Apx III und I DNA nicht valide ermittelt werden, da es keine Referenzwerte gibt, ob diese Toxine zu dem jeweiligen Untersuchungszeitpunkt von den Tieren sezerniert wurde. Für eine aussagekräftige Beantwortung dieser Fragestellung besteht Forschungsbedarf.

Eine signifikante Assoziation zwischen dem Nachweis von Apx III DNA in OFS ($p < 0,001$) und einer verlängerten Mastdauer wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Dies verdeutlicht die klinische Bedeutung der Apx-Toxine. Zusammenhänge zwischen APP-Infektionen und der Länge der Mastdauer wird detailliert in Kapitel IV.4. „Mastdauer“ diskutiert.

Um eine Aussage über das Vorkommen des Apx III und I Toxin-Musters treffen zu können, muss anhand der vorliegenden Ergebnisse eine Tiergruppe in der ersten Woche nach der Einstellung in die Mast täglich beprobt werden. Das Apx-Toxin-Muster kann als Indikator für den Grad der Virulenz der vorhandenen APP ST genutzt werden und es können auf dieser Grundlage frühzeitig Maßnahmen zur Minimierung von klinischen Ausbrüchen eingeleitet werden (BECK et al., 1994).

3. Nachweis spezifischer Antikörper in Stichblutproben

In der vorliegenden Arbeit wurden während des Schlachtvorgangs Stichblutproben von Tieren aus Betrieb A und Betrieb B entnommen. Dabei konnten die Stichblutproben eindeutig Tieren einer Bucht zugeordnet werden.

Bei der Untersuchung von Stichblutproben wurden in Betrieb A 91,5% und in Betrieb B 94,2% der untersuchten Proben als Apx IV Antikörper positiv gewertet. In anderen Studien fällt die Innerherd-Prävalenz von Antikörpern

gegen Apx IV deutlich niedriger aus. In einer belgischen Untersuchung wurde die Innerherd-Prävalenz von Antikörpern gegen Apx IV auf 63% bei Schlachtschweinen beziffert (MEYNS et al., 2011). Bei deutschen Schlachtschweinen, die aus Betrieben mit rezidivierender Atemwegsproblematik stammen, betrug die Innerherd-Prävalenz von Antikörpern gegen Apx IV 62% (RENKEN, 2017). In einer italienischen Studie wurden bei 74,4% der untersuchten Mittelmastschweine Antikörper gegen Apx IV nachgewiesen (MERIALDI et al., 2012).

Die Serokonversion gegen Apx IV wird mit etwa drei Wochen p. inf. beschrieben und ein Antikörper-Anstieg hält bis zu 55 Tage p. inf. an (DREYFUS et al., 2004; EAMENS et al., 2012). Im Serum ist der Nachweis von Antikörpern gegen Apx IV für 120 Tage möglich (SCHALLER et al., 1999). Deshalb ist der Apx IV Antikörpernachweis auch für die Detektion von persistierenden Infektionen oder für Monate zurückliegende Infektionen geeignet (SCHALLER et al., 1999; DREYFUS et al., 2004). In einer Studie wird hingegen beschrieben, dass bereits nach 4-6 Wochen ein positiver Antikörperspiegel im Serum in einen als negativ zu wertenden Antikörpertiter übergeht (EAMENS et al., 2012). Des Weiteren ist zu beachten, dass subklinische Infektionen, welche sich auf die Tonsillen beschränken, nicht zwangsläufig zu einer Serokonversion führen (CHIERI et al., 2002a). Ein großer Vorteil ist, dass Apx IV speziesspezifisch ist und von keinem anderen bisher bekanntem Bakterium sezerniert wird (SCHALLER et al., 1999).

In der vorliegenden Studie wurde ein kommerziell erhältlicher Apx IV ELISA verwendet. Für kommerziell erhältliche Apx IV ELISA ist die Spezifität mit 100% und Sensitivität mit 93,8% beschrieben (DREYFUS et al., 2004). In einer anderen Studie wurde hingegen nach einer experimentellen Infektion mit *Pasteurella multocida* von einem Apx IV ELISA 29% falsch-positive Testresultate produziert, sodass die Spezifität hier nur 71% betrug (EAMENS et al., 2012). Eine hohe Anzahl von falsch-positiven Ergebnissen wäre eine mögliche Erklärung für die hohe Innerherd-Prävalenz in der vorliegenden Studie. Andererseits wird auch permanent Apx IV DNA, welche für die Antikörper-Bildung verantwortlich sind, in nahezu allen Buchten nachgewiesen (SCHALLER et al., 1999).

Es ist ausgeschlossen, dass die Antikörper in den Stichblutproben maternalen Ursprungs sind, da die durchschnittliche Halbwertszeit für maternale Antikörper bei zwei Wochen liegt. Die Abnahmedauer im Serum der Tiere hängt

zwar von der aufgenommenen Gesamtmenge an maternalen Antikörpern ab (GARDNER et al., 1991; VIGRE et al., 2003), jedoch wird die Nachweisgrenze in der Literatur zwischen der zweiten Lebenswoche und dem zweiten Lebensmonat beschrieben (VIGRE et al., 2003; SJÖLUND et al., 2011).

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass zwischen den Antikörpernachweisen von Apx IV und dem Nachweis von Apx IV DNA in OFS in den verschiedenen Buchten eine vollkommene Übereinstimmung besteht. Dies bestätigt die hohe angegebene Spezifität der Apx IV PCR für OFS (vgl. XI.3.).

Der Nachweis von Antikörpern gegen Apx III-I gelang in allen untersuchten Stichblutproben von Schweinen aus Betrieb A und Betrieb B. Innerherd-Seroprävalenzen von Antikörpern gegen Apx III-I variieren stark altersabhängig (GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2014). Allgemein ist die niedrigste Seroprävalenz von Antikörper gegen APP-Bestandteile in der 12. Lebenswoche zu erwarten, was durch den Abfall der maternalen Antikörper zustande kommt (CRUIJSEN et al., 1995; CHIERS et al., 2002b). Ein Anstieg der Antikörper erfolgt gegebenenfalls ab der 16. bis zur 23. Lebenswoche (CHIERS et al., 2002b). In einer Querschnittsstudie wurde bei über 25 Wochen alten Tieren die Innerherd-Seroprävalenz von Antikörpern gegen Apx III, II und I mit 100% beschrieben (GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2014). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Studie. Andererseits wurden in einer weiteren Studie im Serum von 10 bis 20 Wochen alten Schweinen Antikörper gegen Apx III in 17,5%, gegen Apx II in 51,25% und gegen Apx I in 71,25% der untersuchten Proben detektiert (SHIN et al., 2011). In einer anderen Studie schwankte die Innerherd-Seroprävalenz von Antikörpern gegen Apx III bei 26 Wochen alten Schweinen zwischen 5 und 10% (DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014). Die Innerherd-Seroprävalenz von Antikörpern gegen Apx II betrug in dieser Studie 70 bis 100% und die Innerherd-Seroprävalenz von Antikörpern gegen Apx I lag zwischen 20 und 100%.

Der Nachweis von Antikörpern gegen OMP gelang in Betrieb A in 100% und in Betrieb B in 97,42% der untersuchten Stichblutproben. In vorherigen Studien lag die Innerherd-Seroprävalenz von Antikörpern gegen OMP bei unter 20% (CHIERS et al., 2002b; DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014).

Die Innerherd-Seroprävalenz von Antikörpern gegen Apx III-I und gegen OMP

ist in verschiedenen Betrieben sehr heterogen (DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014).

In dem Porcilis APP® Impfstoff sind Apx III-I, sowie das 42 kDa OMP enthalten, daher ist der Nachweis von Antikörper gegen diese Virulenzfaktoren von besonderer Bedeutung (TUMAMAO et al., 2004a). Mit dieser Subunit-Vakzine geimpften Tiere haben höhere Antikörpertiter gegen Apx III, I und OMP als nicht geimpfte Tiere. Für Antikörper gegen Apx II ist dies allerdings nicht immer der Fall (KRISTENSEN et al., 2004a; TUMAMAO et al., 2004a; JIRAWATTANAPONG et al., 2008).

In Betrieb A enthielten alle Stichblutproben Antikörper gegen Apx III-I und das OMP. Eine Impfung mit dem Porcilis® APP Impfstoff kann hierfür mitverantwortlich sein (DREYFUS et al., 2004; TUMAMAO et al., 2004a; JIRAWATTANAPONG et al., 2008). Außerdem wurde in allen acht Buchten Apx IV, III und I DNA nachgewiesen. Der Antikörperrnachweis und der Antigennachweis stimmen in allen acht Buchten überein. Zu den Apx II Nachweisen können keine Aussagen getroffen werden, da diese in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurden. In einer Studie mit Porcilis® APP geimpften Tieren lag die Seroprävalenz für Antikörper gegen Apx I und II bei 100%. Die Seroprävalenz für Antikörper gegen Apx III und das OMP betrug lediglich ungefähr 50% (DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014).

Der Anteil an nachgewiesenen Antikörpern ist in Betrieb A gegen Apx III-I und das OMP höher als der Anteil an nachgewiesenen Antikörpern gegen Apx IV. Dies kann im Zusammenhang mit der APP-Impfung stehen, da dieses Phänomen auch für die Differenzierung von gesunden, geimpften Tieren und infizierten Tieren genutzt wird. Hierbei besitzen nicht infizierte, geimpfte Tiere keine Antikörper gegen Apx IV, dafür allerdings Antikörper gegen Apx III-I und gegen OMP (DREYFUS et al., 2004).

In Betrieb B ist der Anteil nachgewiesener Antikörper gegen Apx III-I und OMP ebenfalls höher als der Anteil detektierter Antikörper gegen Apx IV. Jedoch wurden die Tiere in Betrieb B nicht geimpft. Der hohe Apx III-I Antikörperrnachweis wäre durch die Expression von Apx-Toxinen möglich, die von anderen Bakterien stammen und daher kein Apx IV bilden. Hierzu zählen unter anderem *A. suis*, *A. rossii* und *A. porcitonisillarum* (VAN OSTAAIJEN et al., 1997; SCHALLER et al., 1999; SCHALLER et al., 2000; KUHNERT et al.,

2005). Des Weiteren sind auch zwischen den OMP und weiteren Bakterien wie *Pasteurella multocida* serologische Kreuzreaktionen bekannt (EAMENS et al., 2012).

Unklar ist, warum in den Buchten 5-7, in denen keine Apx III DNA in OFS während des gesamten Versuchs detektiert werden konnte, alle Stichblutproben Antikörper gegen Apx III aufweisen. Die Antikörperrückmeldung gegen Apx I in Betrieb B sind ebenfalls nicht schlüssig, da über den gesamten Untersuchungszeitraum in Betrieb B keine Apx I DNA in OFS nachgewiesen wurde. Dies bedeutet, dass auch von den oben genannten Bakterien keine Apx-Toxine stammen können, da keine Apx III und I DNA detektiert wurde. Eine Möglichkeit wäre, dass weitere, beim Schwein seltener vorkommende Bakterien wie *A. equuli* und *Pasteurella aerogene* Proteine sezerniert haben, die eine 80-100 kDa kleinere Molekularmasse als die Apx III-I besitzen und mit diesen kreuzreagierten (HOMMEZ & DEVRIESE, 1976; SCHALLER et al., 2000; RAMOS-VARA et al., 2008). Ebenfalls könnten Kreuzreaktionen zwischen Apx III-I und weiteren RTX-Toxinen der Grund für die positiven Apx III-I ELISA Werte sein. Zu den hierfür verantwortlichen RTX-Toxinen zählt das hlyA-Toxin, welches von alpha-haemolisierenden *Escherichia coli* sezerniert wird (DEVENISH et al., 1989).

Des Weiteren wäre es möglich, dass die Antikörper von einem Zeitraum vor dem Versuchsbeginn stammen. Hierzu wurde in einer Studie gezeigt, dass zwei Wochen nach der Exposition eines Apx-Toxins Antikörper gegen dieses Toxin detektierbar waren und ein 17-wöchiger, stabiler, nachweisbarer Antikörpertiter folgte (MONTARAZ et al., 1996).

In der Literatur wird in einer Studie die Spezifität für Apx III, II und I ELISA mit 96% beschrieben. Zusätzlich ist die Sensitivität in dieser Studie für Apx III ELISA mit 92,5%, für Apx II ELISA mit 95% und für Apx I ELISA mit 100% angegeben (SHIN et al., 2011). Andere Autoren sehen indes die Spezifität der Apx III-I ELISA kritischer, da Kreuzreaktionen zu weiteren gramnegativen Bakterien bekannt sind (NIELSEN et al., 2000). Zusätzlich gibt es Kreuzreaktionen zwischen den Apx III-I Toxinen selbst (GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2014).

Zwischen dem Nachweis von Antikörpern gegen Apx III und I und dem Nachweis von Apx III und I DNA in OFS besteht in der vorliegenden Studie

eine erhebliche Diskrepanz. Auf Grund dieser Diskrepanz und bekannter Kreuzreaktionen ist davon auszugehen, dass es sich bei den Ergebnissen um unspezifische Antikörper-Reaktionen handelt (HOMMEZ & DEVRIESE, 1976; MONTARAZ et al., 1996; SCHALLER et al., 2000; RAMOS-VARA et al., 2008; GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2014).

Um in serologischen Tests falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse zu minimieren, ist die Wahl des Cut-Offs ein entscheidendes Kriterium (JACOBSON, 1998) und sollte für diese Tests überprüft werden.

4. Mastdauer

Die Länge der Mastdauer wird von vielen Faktoren beeinflusst (HYUN et al., 1998). Verminderte Tageszunahmen, bedingt durch eine reduzierte Futteraufnahme und -verwertung, sind hierbei entscheidende Parameter (HYUN et al., 1998).

In der vorliegenden Studie wurde in Betrieb B gezeigt, dass zwischen Tieren aus Buchten in denen Apx III DNA in OFS nachgewiesen wurde und der Länge der Mastdauer eine signifikante Assoziation ($p < 0,01$, $r = 0,293$) besteht. Tiere aus Buchten, in denen Apx III DNA in OFS nachgewiesen wurde, wiesen eine verlängerte Mastdauer von 5,6 Tagen auf.

Des Weiteren gab es in Betrieb B signifikante Korrelationen ($p < 0,01$; $r = 0,204$) zwischen der Höhe der gesamt nachgewiesenen Apx IV DNA in OFS in verschiedenen Buchten und der Länge der Mastdauer von Tieren aus diesen Buchten. Die Höhe der insgesamt nachgewiesenen Apx III DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten und die Länge der Mastdauer von Tieren aus diesen Buchten in Betrieb A ($p < 0,01$; $r = 0,284$) und Betrieb B ($p < 0,01$; $r = 0,248$) korrelierte signifikant miteinander. In Betrieb A bestand eine signifikante Korrelation ($p < 0,01$; $r = 0,262$) zwischen der gesamt quantitativ gemessenen Apx I DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten und der Länge der Mastdauer von Tieren aus diesen Buchten. Aufgrund dieser Korrelationen zeigte sich, dass je höher die detektierte Apx-DNA-Menge in OFS war, desto länger war die Mastdauer.

Aus der Literatur ist bekannt, dass APP-Infektionen einen negativen Einfluss auf die Höhe der Tageszunahmen von Schweinen haben (UEDA et al., 1995). In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit wurde in

einer Studie bei subklinisch mit APP infizierten Tieren ebenfalls eine verlängerte Mastdauer nachgewiesen. Die Mastdauer der subklinisch infizierten Tiere war in der Studie um 5,64 Tage verlängert, verglichen mit nicht infizierten Tieren (ROHRBACH et al., 1993). Auch in einem Versuch, bei dem Tiere experimentell mit APP infiziert wurden und es zu einer subklinischen Infektion kam, wurde eine deutliche Reduktion der Tageszunahmen um 141 g pro Tag bei den Tieren gezeigt (MAROIS et al., 2009). Hingegen wurde in einer anderen Studie bei Tieren mit höheren Antikörpertitern gegen Apx IV auch höhere Tageszunahmen bestimmt (ASSAVACHEEP et al., 2003).

Bei experimentell infizierten Tieren nehmen bei einer klinischen APP-Infektion die Tageszunahmen serotypabhängig ab. Es wurde in diesem Versuch gezeigt, dass nach einer Infektion mit einem APP ST 15 die Tageszunahmen deutlich stärker abnahmen als nach einer Infektion mit einem APP ST 1 (TUMAMAO et al., 2004b). Daneben weisen auch chronisch infizierte Tiere mit ausgeprägten Pleuritiden verminderte Tageszunahmen auf (GOZIO et al., 2006).

In der vorliegenden Studie wurden Pleuritiden nur in einem geringen Maße nachgewiesen. Es gibt in dieser Arbeit keinen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Pleuritiden und der Länge der Mastdauer. Eine mögliche Regeneration der Pleuritiden bis zum Schlachtttermin ist vorstellbar (MOUSING et al., 1990), erscheint jedoch auf Grund der fehlenden Klinik in beiden Betrieben unwahrscheinlich.

Tiere, die ihr Immunsystem vermehrt in Anspruch nehmen, weisen schlechtere Tageszunahmen auf (LOYNACHAN et al., 2005). Durch immunologischen Stress sind verminderte Tageszunahmen von 10 bis zu 20% beschrieben (LEE et al., 2005). Bei einer akuten APP-Infektion werden proinflammatorische Zytokine sezerniert (BAARSCH et al., 1995; CHOI et al., 1999; BERCIER et al., 2018). Die durch den immunologischen Stress freigesetzten proinflammatorischen Zytokine, wie der Tumornekrose Faktor alpha (TNF-alpha) und das Interleukin I (IL-I) hemmen die Futteraufnahme und -verwertung. (KLASING et al., 1987; KAPAS et al., 1992). In einer Studie konnte eine Apx I konzentrations- und zeitabhängige Expression von TNF-alpha und IL- I von pulmonalen Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden (CHEN et al., 2011). Hingegen können Akute-Phase Proteine als Indikator für subklinische Infektionen verwendet werden. Sie sind ebenfalls mit einer verminderten Futteraufnahme und -verwertung korreliert, woraus sich eine verminderte

Mastleistung ergibt (CLAPPERTON et al., 2005; SORENSEN et al., 2006). Die Produktion und Sekretion von Akute-Phase Proteine wird unter anderem von proinflammatorischen Zytokinen initiiert (CLAPPERTON et al., 2005). Inwieweit eine verlängerte Mastdauer von subklinisch APP infizierten Tieren im Zusammenhang mit Akute-Phase Proteinen oder proinflammatorischen Zytokinen steht, bleibt zu klären.

In der vorliegenden Studie kann der erhöhte Apx-DNA-Nachweis in OFS als Zeichen einer vermehrten immunologischen Belastung angesehen werden. Aus diesem immunologischen Stress resultierend lassen sich verminderte Tageszunahmen ableiten, die auf die verlängerte Mastdauer in den jeweiligen Buchten in Betrieb A und Betrieb B rückschließen lassen (CLAPPERTON et al., 2005; LEE et al., 2005).

Neben dem hier beschriebenen Einfluss von subklinischen APP-Infektion auf die Länge der Mastdauer wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass zwischen der Höhe des Madec Score und der Länge der Mastdauer ein signifikanter Zusammenhang in Betrieb B ($p < 0,01$, $r = 0,216$) besteht. Bei dem Madec Score handelt es sich um ein Scoring-System, mit dessen Hilfe die pathologisch-anatomischen Veränderungen des Lungenparenchyms bewertet werden. Dabei werden EP-ähnliche Läsionen begutachtet (MADEC & KOBISCH, 1982). Typische EP Läsionen können von verschiedenen Erregern verursacht werden (PIETERS & MAES, 2019). Hierzu zählen neben *M. hyopneumoniae* auch *Pasteurella multocida*, IAV und das *Swine Herpesvirus 1* (*Aujeszky'sche Krankheit*) (PIETERS & MAES, 2019). Des Weiteren können Bronchopneumonien mit kranioventralen Konsolidierungen (EP ähnliche Läsionen) durch die Beteiligung von *Streptococcus suis*, *Glässerella parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* und *Trueperella pyogenes* auftreten (FRAILE et al., 2010; YAEGER & VAN ALSTINE, 2019). Häufig sind mehrere Erreger des PRDC an der Entwicklung von EP-ähnlichen Läsionen beteiligt (FRAILE et al., 2010). Neben infektiösen Erregern führen auch Fehler im Lüftungsmanagement zu einer erhöhten Prävalenz von EP-ähnlichen Läsionen bei Schlachtschweinen (FRAILE et al., 2010).

Welche Erreger für die EP-ähnlichen Läsionen in der vorliegenden Arbeit verantwortlich sind, kann nicht geklärt werden, da diese pathologischen Veränderungen des Lungengewebes nicht weiter analysiert wurden.

Die in der vorliegenden Studie gezeigte Korrelation zwischen der Höhe der

EP-ähnlichen Läsionen und einer verminderten Mastleistung wird auch von weiteren Autoren beschrieben (PAGOT et al., 2007; BREWSTER et al., 2017; FERRAZ et al., 2020). Konsolidierte Lungenbereiche haben einen negativen Einfluss auf die Tageszunahmen. Hierzu konnte in einer Studie festgestellt werden, dass pro Prozent konsolidiertem Lungengewebe, die Tageszunahmen um 1,8 g gehemmt werden (FERRAZ et al., 2020).

Durch eine Co-Infektion von APP und *Mycoplasma hyopneumoniae* kommt es ebenfalls zu verminderten Tageszunahmen (MAROIS et al., 2009). Die klinische Ausprägung einer APP-Infektion und Lungenläsionen werden durch eine *Mycoplasma*-Infektion potenziert (YAGIHASHI et al., 1984; MAROIS et al., 2009). In der vorliegenden Studie kam es nur zu milden und subklinischen APP-Infektionen, sodass angenommen werden kann, dass es nicht zu einer massiven Potenzierung der APP-Infektion durch *Mycoplasma hyopneumoniae*-Infektionen kam. Allerdings sind vermutlich beide Infektionen für eine verlängerte Mastdauer mitverantwortlich.

Da es sich in der vorliegenden Arbeit um eine Feldstudie handelt, ist davon auszugehen, dass weitere Faktoren die Mastdauer mitbeeinflusst haben. Diese Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

Mögliche Einflussfaktoren der Tageszunahmen und der Futterverwertung sind nicht infektiöse Umgebungsstressoren wie klimatische Bedingungen, wozu die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit zählen (MORRISON et al., 1969; HYUN et al., 1998). Auch soziale Stressoren wie Neugruppierungen von Tieren und ein vermindertes Platzangebot beeinflussen die Tageszunahmen (HYUN et al., 1998). Weitere entscheidende Faktoren für die Höhe der Tageszunahmen ist die Genetik der Tiere und das Geschlecht (COLE et al., 1968; CÖP & BUITING, 1977; ROHRBACH et al., 1993). Zusätzlich beeinflusst das zur Verfügung stehende Futter und Wasser die Mastleistung enorm (COLE et al., 1968; KAMPHUES, 2013). Aber auch der Gesundheitsstatus der Tiere ist für die Länge der Mastdauer mitverantwortlich. Durch Erkrankungen des Magen-Darmtrakts und daraus resultierenden Verdauungsstörungen, wird die Mastleistung negativ beeinflusst (WENDT et al., 2013). Ebenfalls haben Erkrankungen des Atemtrakts, wie oben bereits genauer beschrieben, einen negative Einfluss auf die Mastleistung (MAROIS et al., 2009; GROßE BEILAGE et al., 2013).

Von besonderem Interesse sind erhöhte Tageszunahmen und eine daraus resultierende verkürzte Mastdauer, da dies einen positiven ökonomischen Effekt für den Schweinemäster hat. Durch eine verkürzte Mastdauer ist es möglich mehr Umtriebe in einem Jahr zu generieren und dadurch kann der Gewinn pro Stallplatz erhöht werden (VERHAAGH & DEBLITZ, 2019).

Anhand des Nachweises und der Höhe von Apx-DNA in OFS ist ein Rückschluss auf eine verlängerte Mastdauer erlaubt, denn in der vorliegenden Studie war es durch den Nachweis von Apx III DNA in OFS möglich eine verlängerte Mastdauer vorherzusagen. Diese Vorhersage wäre in der vorliegenden Studie bereits am Ende der ersten Woche nach der Einstellung möglich gewesen.

5. Monitoringprogramm

Die erfolgreiche Kontrolle über die Pleuropneumonie hängt in starkem Maße von der präzisen und frühen Diagnose der Infektion ab (DUBREUIL et al., 2000).

Betriebe, die einen hohen Gesundheitsstatus aufweisen und frei von APP sind, sollten dafür sorgen, diesen Status aus gesundheitlichen und auch wirtschaftlichen Aspekten aufrecht zu erhalten (GOTTSCHALK, 2015; GOTTSCHALK, 2019). Dabei sind Monitoringprogramme als laufende Testprogramme mit der Absicht, Infektionen frühzeitig zu erkennen, das Mittel der Wahl (CANNON, 1982; GOTTSCHALK, 2019).

Eine einheitliche Übereinkunft für ein Monitoringprogramm, welches den Status „APP freier Bestand“ bescheinigt, gibt es zu diesem Zeitpunkt nicht (SASSU et al., 2018). Die Empfehlungen hierzu reichen von mindestens 30 Serumproben von 6 Monate alten Tieren, welche zwei bis viermal pro Jahr genommen und untersucht werden sollen, bis hin zu 15 Serum- oder Tonsillenkratzproben, die es viermal jährlich zu gewinnen und auszuwerten gilt (NATHUES et al., 2013; Gottschalk zitiert nach SASSU et al., 2018). Eine dänische Zuchtorganisation setzt hingegen für die Einstufung eines Betriebes als „APP spezifisch pathogenfreier Bestand“ voraus, dass monatlich 20 Tiere über einen Zeitraum von 24-36 Monate negativ auf APP getestet werden (SZANCER, 2008).

Problematisch bei der serologischen Beprobung von Zukaufstieren in einem typischen Alter zwischen der 10.-12. Lebenswoche ist die in der

12. Lebenswoche am niedrigsten zu erwartende Seroprävalenz. Eine Serokonversion findet häufig erst in der 16. bis 23. Lebenswoche statt (CHIERs et al., 2002b; EAMENS et al., 2008). Mit zunehmendem Alter der Schweine steigt die serologische Innerherd-Prävalenz von APP an (OPRIESSNIG et al., 2013).

Die beschriebene Serokonversion erfolgt für das Monitoring von Zukaufstieren zu einem zu späten Zeitpunkt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der APP-DNA-Nachweis in OFS mindestens eine Woche vor der Serokonversion gelingt (CHIERs et al., 2002b; COSTA et al., 2012).

Der Gebrauch von Tonsillenkratzproben gilt derzeit als geeignetes Mittel, um subklinisch infizierte Tiere frühzeitig zu detektieren (CHIERs et al., 2001). Jedoch ist die richtige Auswahl des Stichprobenumfangs ein entscheidender Faktor für die erfolgreiche Durchführung von Screenings und Monitoringprogrammen, um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden. Dabei ist die Höhe der Prävalenz der APP-Infektion bei der Untersuchung von Tiergruppen von besonderer Bedeutung (CANNON, 1982). In einer Querschnittsuntersuchung wurde bei 10 Wochen alten Schweinen bei 47% der Tiere Apx IV DNA mittels Tonsillenkratzprobe nachgewiesen (TOBIAS et al., 2014). Bei einer angenommenen Prävalenz von 40% wäre bei einer ebenfalls angenommenen Sensitivität der PCR von über 99% (vgl. XI.3.) und einer Tiergruppegröße von 200 Tieren eine Beprobung von sechs Tieren notwendig, um mit einem Konfidenzintervall von 95% und einer Fehlerwahrscheinlichkeit kleiner 5% bei zufällig ausgewählten Tieren ein infiziertes Tier zu detektieren (CANNON, 1982). Dabei wäre die Verwendung von sechs Tonsillenkratzproben eine geeignete Methode (GOTTSCALK, 2015). Durch den Einsatz von OFS ist der Stichprobenumfang bereits bei der Verwendung einer OFS gegeben, da bis zu 25 Tiere mit einer OFS beprobt werden können (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Das Ergebnis der nachgewiesenen Apx IV DNA in OFS in der vorliegenden Studie von mehr als 90% stützt diese Erkenntnis.

Die bisher üblichen Monitoringprogramme sind zeit- und kostenintensiv, darüber hinaus sind sie belastend für die Tiere (NATHUES et al., 2013; FABLET et al., 2017). Die Verwendung von OFS ermöglicht hingegen eine schnelle und nicht invasive, tierfreundliche Anwendung mit einem großem Stichprobenumfang von bis zu 25 Tieren pro OFS (PRICKETT & ZIMMERMAN, 2010; FABLET et al., 2017; HERNANDEZ-GARCIA et al.,

2017; BJUSTROM-KRAFT et al., 2018). Das Monitoring auf APP-Freiheit ist bereits am Tag der Einstellung von neu zugekauften Jungsauen oder Mastläufern möglich und bietet großes Potential, APP infizierte Tiere frühzeitig zu erkennen. Bis zur Bestätigung eines negativen APP-Ergebnis sollten vor allem Jungsauen in einer Quarantäne mit erhöhten Biosicherheitsmaßnahmen verweilen (GOTTSCHALK, 2019).

Limitierend ist zu beachten, dass der Apx IV DNA-Nachweis nur sinnvoll ist, wenn die Herde APP frei ist und zur Überwachung der Freiheit von APP-Infektionen genutzt wird (GOTTSCHALK, 2019).

Andererseits können die OFS bei APP-infizierten Herden zur Bestimmung eines Toxin-Musters in einem Betrieb genutzt werden. Dieses kann als Indikator für die Virulenz verwendet werden, um gegebenenfalls frühzeitig die Eindämmung und Minimierung des klinischen Ausbruchs mit entsprechenden Maßnahmen zu bewirken. Zu solchen Maßnahmen zählen die Etablierung einer APP-Impfung, eine zusätzliche Reduktion von Risikofaktoren wie dem Umgebungsstress und eine Erhöhung der innerbetrieblichen Biosicherheit (ROSENDAL & MITCHELL, 1983; BECK et al., 1994; MAES et al., 2001; ŠATRÁN et al., 2003; GOTTSCHALK, 2019). Dabei ist es sinnvoll, zu mehreren Zeitpunkten Proben zu gewinnen, da es nicht immer möglich ist, alle im Bestand vorhandenen APP ST zeitgleich nachzuweisen. Dies ist abhängig von der im Betrieb vorhandenen Anzahl an APP ST und den Stressfaktoren (BECK et al., 1994; CHIERS et al., 2002b; VAN DIXHOORN et al., 2016). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Probengewinnung über die gesamte erste Woche das exakte Toxin- Muster für Apx IV, III und I widerspiegelt.

Aus psychologischer Sicht bietet das Monitoring mit Hilfe von OFS ebenfalls einen Zugewinn, sodass davon auszugehen ist, dass es vermehrt praktiziert werden wird. In der Psychologie des Menschen wird zum Erreichen eines Ziels stets eine innere (gedankliche) Kosten-Nutzenanalyse durchgeführt. Wenn der Aufwand zu Gunsten des Nutzens verbessert wird, ist es wahrscheinlicher, dass eine Handlung vollzogen wird (KUKLA, 1972). Da der Aufwand, Tiere durch OFS zu überwachen, deutlich geringer ist, als dies bei herkömmlichen Methoden der Fall ist, werden potentiell mehr Monitorings durchgeführt werden. Im Allgemeinen besteht bereits eine hohe Akzeptanz, Diagnostik mittels OFS durchzuführen. Insbesondere bei anderen Erreger des Schweines wird die Probengewinnung mittels OFS bereits routinemäßig verwendet (BJUSTROM-

KRAFT et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich der Einsatz von OFS für den Apx-DNA-Nachweis für Monitoringprogramme und Screenings eignet. Hierbei besteht ein großes Potenzial, die Pleuropneumonie frühzeitig zu erkennen und dadurch sowohl klinische Ausbrüche als auch deren Verbreitung reduzieren zu können.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Apx-DNA in OFS unter Feldbedingungen zu untersuchen und zu analysieren. Hierzu werden folgende Hypothesen überprüft:

- 1) In Mastbeständen mit APP infizierten Tieren ist Apx-DNA in OFS unter Feldbedingungen nachweisbar.
- 2) Der Nachweis von Apx IV DNA sowie Apx III und I DNA ist in OFS möglich.
- 3) Eine engmaschige Beprobung der Mastschweine mittels OFS ist für einen Apx-DNA-Nachweis vorteilhafter als eine einmalige oder weitmaschige Beprobung.

In zwei konventionellen Mastbeständen mit APP infizierten Tieren wurde in einer Verlaufsstudie unter Feldbedingungen der Apx-DNA-Nachweis in OFS untersucht. In beiden Betrieben wurden OFS in der ersten Woche nach der Einstellung täglich und danach in einem zweiwöchentlichen Abstand bis zur Schlachtung gewonnen. In Betrieb A wurden die Tiere mit einem APP-Impfstoff geimpft (Porcilis® APP). Unmittelbar vor den Impfungen wurden jeweils OFS gewonnen. Die Schweine in Betrieb B wurden nicht geimpft. Es war nicht vorgesehen die Tiere aus den verschiedenen Betrieben miteinander zu vergleichen. Insgesamt konnten in Betrieb A 217 und in Betrieb B 230 OFS analysiert werden. Alle OFS wurden auf Apx IV, III und I DNA mittels einer APP qPCR untersucht. Zusätzlich wurde für die Bestimmung von Antikörpertiter gegen Apx IV-I und OMP Stichblutproben analysiert, die während des Schlachtvorgangs von Tieren aus Betrieb A und Betrieb B genommen wurden. Des Weiteren wurde eine Begutachtung der Lungen von den Schweinen aus Betrieb A und Betrieb B während der Schlachttierkörper-Untersuchung durchgeführt. Die Lungen wurden mittels Scoring-Systemen auf das Vorhandensein von pathologischen Veränderungen des Lungenparenchyms (Maded Score) und Pleuritiden (SPES) beurteilt.

Der Nachweis von Apx IV DNA in OFS gelang vom ersten Tag an nahezu kontinuierlich in 91,7% der untersuchten OFS in Betrieb A und in 96,5% der untersuchten OFS in Betrieb B. Die Analyse der Stichblutproben ergab, dass Antikörper gegen Apx IV in Betrieb A in 91,5% und in Betrieb B in 94,2% der

untersuchten Proben nachweisbar waren. Eine Apx III DNA Detektion gelang in Betrieb A bei 47,9% und in Betrieb B bei 38,3% der analysierten OFS. Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg konnte jedoch in drei Buchten in Betrieb B keine Apx III DNA in OFS nachgewiesen werden. Alle untersuchten Stichblutproben enthielten hingegen Antikörper gegen Apx III. Apx I DNA wurde ausschließlich in Betrieb A nachgewiesen. Der Nachweis von Antikörper gegen Apx I war indes in allen Stichblutproben möglich.

Schweine aus Buchten, in denen während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine Apx III DNA in OFS nachgewiesen wurde, wiesen eine signifikant verkürzte Mastdauer auf verglichen mit Tieren aus Buchten, in denen Apx III DNA in OFS nachgewiesen wurde. Des Weiteren zeigte sich, dass, je höher die gesamt gemessene Apx IV DNA (in Betrieb B), Apx III DNA oder Apx I DNA (in Betrieb A) in OFS in einer Bucht war, desto länger war die Mastdauer von den Tieren aus dieser Bucht. Daneben korrelierte in Betrieb B die Höhe des Madec Scores (EP-ähnlichen Läsionen) signifikant mit einer verlängerten Mastdauer.

Die zugrunde gelegten Hypothesen in der vorliegenden Arbeit können abschließend wie folgt beantwortet werden: Der Nachweis von Apx-DNA in OFS ist in Mastbeständen mit APP infizierten Tieren unter Feldbedingungen möglich. Des Weiteren kann sowohl Apx IV DNA als auch Apx III und I DNA in OFS detektiert werden. Die Beurteilung einer engmaschigen Beprobung von Mastschweinen mittels OFS für einen Apx-DNA-Nachweis muss differenziert beantwortet werden. Die engmaschige Beprobung für den Nachweis von Apx III und I DNA in OFS ist vor allem in der ersten Woche nach der Einstellung in die Mast vorteilhafter als eine weitmaschige Beprobung. Keine nennenswerten Vorteile bietet hingegen die engmaschige Beprobung für einen Apx IV DNA-Nachweis gegenüber einer einmaligen oder weitmaschigen Beprobung der gesamten Tiergruppe.

VII. SUMMARY

Use of oral fluid samples to detect Apx-DNA under field conditions

The purpose of the present study is to analyze the detection of Apx-DNA in oral fluid samples under field conditions. The following hypotheses were tested:

- 1) It is possible to detect Apx-DNA in OFS on farms with APP infected fattening pigs under field conditions.
- 2) The detection of Apx IV, III and I DNA is possible in OFS.
- 3) A close-meshed sampling of fattening pigs by means of OFS is beneficial compared to a one-time or wide-meshed sampling for an Apx-DNA observation.

In two conventional fattening herds infected with APP, the Apx-DNA detection in OFS has been examined under field conditions in a longitudinal study over the entire fattening period. In the first week after the stabling, OFS were obtained on a daily basis and then every two weeks. At farm A, the animals were vaccinated with an APP vaccine (Porcilis® APP). OFS were taken immediately before the vaccination. The pigs in farm B were not vaccinated. It was not intended to compare the animals from the different farms. In total, 217 OFS from farm A and 230 OFS from farm B could be analyzed. All OFS were examined for Apx IV, III and I DNA using an APP qPCR. During the slaughtering process, random sticking blood samples were taken from most of the animals and checked for antibodies against Apx IV-I and the OMP. Furthermore, an assessment of the lungs was carried out during the carcass examination. The lungs were evaluated for pathological changes in the lung parenchyma (Madec score) and the presence of pleurisy (SPES).

The detection of Apx IV DNA in OFS succeeded almost continuously from the first day in 91.7% of the examined OFS at farm A and in 96.5% of the examined OFS at farm B. The detection of antibodies against Apx IV was possible in 91.5% at farm A and at 94.2% at farm B of the analyzed samples. Apx III DNA was detected at farm A in 47.9% and at farm B in 38.3% of the examined OFS. It was not possible to detect Apx III DNA in OFS in three pens on farm B over the entire study period. All blood samples examined contained antibodies against Apx III. Evidence of Apx I DNA was only found on farm A. However, antibodies

against Apx I were also detected in all random sticking blood samples from farm A and farm B.

Pigs from pens, where no Apx III DNA was detected in OFS over the entire study period showed a significantly shorter fattening period compared to pigs from pens in which Apx III DNA was detected in OFS. Furthermore, it became clear that the higher total measured Apx IV DNA (on farm B) respectively Apx III DNA or Apx I DNA (on farm A) in OFS in a pen, the longer the fattening period of the pigs of this pen. In addition, on farm B the level of the Madec score (EP- like lesions) significantly correlates with a longer fattening period.

The hypotheses, on which the present work is based, can finally be answered as follows:

The detection of Apx-DNA in OFS is possible in fattening herds with APP infected animals under field conditions. Furthermore, Apx IV DNA as well as Apx III and I DNA can be detected in OFS. The evaluation that close-meshed sampling of fattening pigs using OFS is beneficial for Apx-DNA detection must be answered in a differentiated manner. On the one hand, the close-meshed sampling of Apx III and I DNA in OFS is particularly advantageous in the first week after stabling in the fattening period compared to a wide-meshed sampling. On the other hand, the close-meshed sampling for the Apx IV DNA detection in OFS does not present any noteworthy advantages compared to a single or wide-meshed sampling of the entire group of animals.

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Anzahl gewonnener oral fluid amples zu den Zeitpunkten der Probengewinnung in Betrieb A und in Betrieb B.</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 2: Schlachthof Pleuritis Evaluations System (SPES Score) nach DOTTORI et al. (2007).....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 3: Bewertungssystem für EP-ähnliche Läsionen betroffener Lungenbereiche eines jeden Lungenlappens (MADEC & KOBISCH, 1982).</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 4: Definition unabhängiger Variablen für die statistische Analyse möglicher Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen dieser Faktoren und der Höhe der gesamt nachgewiesenen Apx IV, III und I (exkl. Apx I in Betrieb B) DNA-Menge in OFS in den Buchten aus denen die Tiere kamen.</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 5: Anzahl gewonnener und auswertbarer OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Betrieb A und Betrieb B (D=Tag nach der Einstellung, W=Woche nach der Einstellung).</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 6: Nachweisrate (%) und absolute Nachweise (n) von Apx IV, III und I DNA aller auswertbaren OFS in Betrieb A und Betrieb B.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 7: Nachweisrate (%) und absolute Nachweise (n) von Apx IV, III und I DNA aller Buchten in OFS in Betrieb A und Betrieb B. Jede Bucht wird zu jedem Zeitpunkt der Probengewinnung als eigenständiges Ergebnis gewertet.</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 8: Nachweisrate (%) und absolute Nachweise (n) von Apx IV, III und I DNA in OFS in verschiedenen Buchten über den gesamten Beprobungszeitraum in Betrieb A und Betrieb B. Die Anzahl der Beprobungszeitpunkte variiert abhängig von der maximalen Mastdauer.</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 9: Anzahl der gewonnenen und den Buchten zuordenbare Stichblutproben von Schweinen je Bucht aus Betrieb A und Betrieb B. Relativer Anteil der gewonnenen Blutproben an den insgesamt geschlachteten Tieren pro Betrieb.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 10: Median der S/P Ratio % des Apx IV ELISA und Median der Antikörpertiter gegen Apx III, II, I und OMP aus Stichblutproben von Schweinen aus Betrieb A und Betrieb B. Zusätzlich Angaben: relative und absolute Anteile der als positiv, negativ und als fraglich gewerteten ELISA-Werte.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 11: Anzahl beurteilter Lungen während der Schlachttierkörper- Untersuchung von Tieren aus Betrieb A und Betrieb B. Differenziert nach Buchten und einer Bucht nicht zuordenbare Lungen. Relativer Anteil (%) an gescorten Lungen von den insgesamt geschlachteten Tieren (n) pro Betrieb.....</i>	<i>53</i>

<i>Tabelle 12: Absolute (n) und relative (%) Anzahl an Pleuritiden der beurteilten Lungen von Schweinen aus Betrieb A und Betrieb B.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 13: Verteilung der SPES Score Werte der beurteilten Lungen in den einzelnen Buchten für Betrieb A und Betrieb B.</i>	<i>55</i>

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Zeitpunkte der Probengewinnung von OFS in Betrieb A mit Angaben zu Impfzeitpunkten, Zeitpunkt der Veränderung der Gruppengröße sowie des ersten und letzten Schlachttermins.</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 2: Zeitpunkte der Probengewinnung von OFS in Betrieb B mit Angaben des ersten und letzten Schlachttermins.</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 3: Summe der nachgewiesenen Mengen ($\log_{10} c/\mu l$) an Apx IV, III und I DNA in OFS in Betrieb A und Betrieb B über den gesamten Untersuchungszeitraum.</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamt nachgewiesenen Apx IV DNA in OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung von Schweinen in Betrieb A (n=16: D0-W4; n=8: W5-15; n=6: W17; n=3: W19).</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamt nachgewiesenen Apx III DNA in OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung von Schweinen in Betrieb A (n=16: D0-W4; n=8: W5-15; n=6: W17; n=3: W19).</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamt nachgewiesenen Apx I DNA in OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung von Schweinen in Betrieb A (n=16: D0-W4; n=8: W5-15; n=6: W17; n=3: W19).</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamt nachgewiesenen Apx IV DNA in OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung von Schweinen in Betrieb B (n=16: D0-W11; n=14: W13; n=8: W15).</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamt nachgewiesenen Apx III DNA in OFS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung von Schweinen in Betrieb B (n=16: D0-W11; n=14: W13; n=8: W15).</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 9: Nachgewiesene Apx IV, III und I DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten in Betrieb A an den Tagen 0-7 nach Einstellung und jeweils deren Mittelwert. Die nachgewiesene DNA-Menge ist semiquantitativ entsprechend der Farbskala dargestellt. Die Buchten 1-4 und 5-8 sind im Abteil sowie graphisch sichtbar nebeneinander angeordnet. Zwischen den Buchten 1-4 und 5-8 befindet sich ein Mittelgang. Die Buchten 1+8; 2+7; 3+6 und 4+5 liegen sich gegenüber.</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 10: Nachgewiesene Apx IV, III und I DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten in Betrieb A in den Wochen 3-19 nach Einstellung und jeweils deren Mittelwert. Die nachgewiesene DNA-Menge ist semiquantitativ entsprechend der Farbskala dargestellt. Die Buchten 1-4 und 5-8 sind im Abteil, sowie graphisch sichtbar nebeneinander angeordnet. Zwischen den Buchten 1-4 und 5-8 befindet sich ein</i>	

<i>Mittelgang. Die Buchten 1+8; 2+7; 3+6 und 4+5 liegen sich gegenüber.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 11: Nachgewiesene Apx IV und III DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten in Betrieb B an den Tagen 0-7 nach Einstellung und jeweils deren Mittelwert. Die nachgewiesene DNA-Menge ist semiquantitativ entsprechend der Farbskala dargestellt. Die Buchten 1-4 und 5-8 sind im Abteil, sowie graphisch sichtbar nebeneinander angeordnet. Zwischen den Buchten 1-4 und 5-8 befindet sich ein</i>	
<i>Mittelgang. Die Buchten 1+8; 2+7; 3+6 und 4+5 liegen sich gegenüber.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 12: Nachgewiesene Apx IV und III DNA-Menge in OFS in verschiedenen Buchten in Betrieb B in den Wochen 3-15 nach Einstellung und jeweils deren Mittelwert. Die nachgewiesene DNA-Menge ist semiquantitativ entsprechend der Farbskala dargestellt. Die Buchten 1-4 und 5-8 sind im Abteil, sowie graphisch sichtbar nebeneinander angeordnet. Zwischen den Buchten 1-4 und 5-8 befindet sich ein</i>	
<i>Mittelgang. Die Buchten 1+8; 2+7; 3+6 und 4+5 liegen sich gegenüber.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 13: S/P Ratio % des Apx IV ELISA aus Stichblutproben von Schweinen pro Bucht in Betrieb A.....</i>	
	<i>50</i>
<i>Abbildung 14: Antikörpertiter gegen Apx III und Apx I aus Stichblutproben pro Bucht in Betrieb A.....</i>	
	<i>50</i>
<i>Abbildung 15: Antikörpertiter gegen Apx II und OMP aus Stichblutproben pro Bucht in Betrieb A.</i>	
	<i>51</i>
<i>Abbildung 16: S/P Ratio % des Apx IV ELISA aus Stichblutproben pro Bucht in Betrieb B.....</i>	
	<i>51</i>
<i>Abbildung 17: Antikörpertiter gegen Apx III und Apx I aus Stichblutproben pro Bucht in Betrieb B.....</i>	
	<i>52</i>
<i>Abbildung 18: Antikörpertiter gegen Apx II und OMP aus Stichblutproben pro Bucht in Betrieb B.....</i>	
	<i>52</i>
<i>Abbildung 19: Mittlerer SPES-Score und Standardabweichung für beurteilte Lungen von Tieren aus den verschiedenen Buchten aus Betrieb A und Betrieb B. (Bucht 0 - konnte keiner Bucht eindeutig zugeordnet werden).....</i>	
	<i>54</i>
<i>Abbildung 20: relativer Anteil (%) der Höhe des Madec Scores der beurteilten Lungen von Schweinen aus Betrieb A und Betrieb B.....</i>	
	<i>56</i>
<i>Abbildung 21: Madec Score der beurteilten Lungen von Tieren aus Betrieb A und Betrieb B aufgeteilt nach verschiedenen Buchten.</i>	
	<i>56</i>
<i>Abbildung 22: Mittlere Mastdauer von Schweinen aus Betrieb A und Betrieb B in verschiedenen Buchten und deren Standardabweichung.....</i>	
	<i>57</i>
<i>Abbildung 23: Qualitative Übereinstimmung des Nachweises von Apx-DNA in OFS</i>	

<i>und von Antikörpern gegen das jeweilige Apx-Toxin für verschiedene Buchten in Betrieb A und Betrieb B.</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 24: Veränderung der relativen Tieranzahl über die gesamte Mastdauer in Betrieb B. Einteilung in Tiere, die aus Apx III DNA in OFS negativen Buchten stammen und Tiere, die aus Apx III DNA in OFS positiven Buchten stammen.</i>	<i>60</i>

X. LITERATURVERZEICHNIS

Andreasen M, Mousing J, Krogsgaard Thomsen L. No simple association between time elapsed from seroconversion until slaughter and the extent of lung lesions in Danish swine. *Preventive Veterinary Medicine* 2001; 52: 147-61.

Angen Ø, Ahrens P, Jessing SG. Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12. *Veterinary Microbiology* 2008; 132: 312-8.

Aper D, Frömbling J, Bağcıoğlu M, Ehling-Schulz M, Hennig-Pauka I. Comparison of metabolic adaptation and biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates from the upper and lower respiratory tract of swine with respiratory disease. *Veterinary Microbiology* 2020; 240: 108532.

Assavacheep P, Persson M, Luengyosluechakul S, Watanaphansak S, Laohasinnarong D, Pungkhun P, Wallgren P. *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Thai pig herds. Prevalence of serum antibodies and relation to performance. *Journal of Veterinary Medicine* 2003; 50: 390-5.

Assavacheep P, Rycroft AN. Survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outside the pig. *Research in Veterinary Science* 2013; 94: 22-6.

Atkinson J, Dawes C, Ericson T, Fox P, Gandara B, Malamud D, Mandel I, Navazesh M, Tabak L. Guidelines for saliva nomenclature and collection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 694: xi-xii.

Baarsch MJ, Scamurra RW, Burger K, Foss DL, Maheswaran SK, Murtaugh MP. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 1995; 63: 3587-94.

Baier S, Brackmann J. *Actinobacillus pleuropneumoniae* – Infektion, Verbesserung der Diagnostik. Landwirtschaftskammer Niedersachsen 2018; 26.04.2018: <https://www.lwk-niedersachsen.de/index.cfm/portal/tier/nav/2048/article/20314.html>. 04.09.2020.

Barrera-Zarate JA, Andrade MR, Pereira CER, Vasconcellos A, Wagatsuma MM, Sato JPH, Daniel AGS, Rezende LA, Otoni LAV, Laub RP, Macedo NR, Costa CM, Haddad JPA, Guedes RMC. Oral fluid for detection of exposure to *Lawsonia intracellularis* in naturally infected pigs. *The Veterinary Journal* 2019; 244: 34-6.

Beck M, van den Bosch JF, Jongenelen IM, Loeffen PL, Nielsen R, Nicolet J, Frey J. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32: 2749-54.

Bélanger M, Dubreuil D, Harel J, Girard C, Jacques M. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infection and Immunity* 1990; 58: 3523-30.

Bercier P, Gottschalk M, Grenier D. Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on barrier function and inflammatory response of pig tracheal epithelial cells. *Pathogens and Disease* 2018; 77: 1-7.

Bertram T. Pathobiology of acute pulmonary lesions in swine infected with *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae*. *Canadian Veterinary Journal* 1988; 29: 574.

Bjuström-Kraft J, Woodard K, Giménez-Lirola L, Rotolo M, Wang C, Sun Y, Lasley P, Zhang J, Baum D, Gauger P, Main R, Zimmerman J. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) detection and antibody response in commercial growing pigs. *BMC Veterinary Research* 2016; 12: 99.

Bjuström-Kraft J, Christopher-Hennings J, Daly R. The use of oral fluid diagnostics in swine medicine. *Journal of Swine Health and Production* 2018; 26: 262-9.

Blackall PJ, Klaasen HLB, Van Den Bosch H, Kuhnert P, Frey J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Veterinary Microbiology* 2002; 84: 47-52.

Bossé JT, Johnson RP, Rosendal S. Capsular polysaccharide antigens for detection of serotype-specific antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1990; 54: 320-5.

Bossé JT, Johnson RP, Nemec M, Rosendal S. Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infection and Immunity* 1992; 60: 479-84.

Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Simon Kroll J, Langford PR. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection* 2002; 4: 225-35.

Bossé JT, Li Y, Angen Ø, Weinert LA, Chaudhuri RR, Holden MT, Williamson SM, Maskell DJ, Tucker AW, Wren BW, Rycroft AN, Langford PR. Multiplex PCR assay for unequivocal differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1 to 3, 5 to 8, 10, and 12. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52: 2380-5.

Bossé JT, Li Y, Fernandez Crespo R, Lacouture S, Gottschalk M, Sárközi R, Fodor L, Casas Amoribieta M, Angen Ø, Nedbalcova K, Holden MTG, Maskell DJ, Tucker AW, Wren BW, Rycroft AN, Langford PR. Comparative sequence analysis of the capsular polysaccharide loci of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1-18, and development of two multiplex PCRs for comprehensive capsule typing. *Veterinary Microbiology* 2018a; 220: 83-9.

Bossé JT, Li Y, Sárközi R, Fodor L, Lacouture S, Gottschalk M, Casas Amoribieta M, Angen Ø, Nedbalcova K, Holden MTG, Maskell DJ, Tucker AW, Wren BW, Rycroft AN, Langford PR. Proposal of serovars 17 and 18 of *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on serological and genotypic analysis. *Veterinary Microbiology* 2018b; 217: 1-6.

Branson BM. State of the Art for Diagnosis of HIV Infection. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 45: S221-S5.

Brewster V, Maiti H, Tucker A, Nevel A. Associations between EP-like lesions

and pleuritis and post trimming carcass weights of finishing pigs in England. *Journal of Livestock science* 2017; 201: 1-4.

Brill N, Krasse BO. The Passage of Tissue Fluid into the Clinically Healthy Gingival Pocket. *Acta Odontologica Scandinavica* 1958; 16: 233-45.

Buettner FFR, Konze SA, Maas A, Gerlach GF. Proteomic and immunoproteomic characterization of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Proteome Science* 2011; 9: 23.

Bunka S, Christensen C, Potter AA, Willson PJ, Gerlach GF. Cloning and characterization of a protective outer membrane lipoprotein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *American Society for Microbiology Journals* 1995; 63: 2797-800.

Busse H-J, Bunka S, Hensel A, Lubitz W. Discrimination of Members of the Family Pasteurellaceae Based on Polyamine Patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1997; 47: 698-708.

Calmettes C, Yu R-h, Silva LP, Curran D, Schriemer DC, Schryvers AB, Moraes TF. Structural variations within the transferrin binding site on transferrin-binding protein B, TbpB. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 12683-92.

Cameron SO, Carman WF. The use of the OraSure® collection device for hepatitis virus testing in health care settings. *Journal of Clinical Virology* 2005; 34: S22-S8.

Cannon R. *Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians*. Australian government publishing service, 1982.

Challacombe S, Russell M, Hawkes JE, Bergmeier LA, Lehner T. Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkeys. *Journal of Immunology* 1978; 35: 923.

Chen Z-W, Chien M-S, Chang N-Y, Chen T-H, Wu C-M, Huang C, Lee W-C, Hsuan S-L. Mechanisms underlying *Actinobacillus pleuropneumoniae* exotoxin ApxI induced expression of IL-1-beta, IL-8 and TNF-alpha in porcine alveolar macrophages. *Veterinary Research* 2011; 42: 25.

Cheong Y, Oh C, Lee K, Cho K-h. Survey of porcine respiratory disease complex-associated pathogens among commercial pig farms in Korea via oral fluid method. *Journal of Veterinary Science* 2017; 18: 283-9.

Chien M-S, Chan Y-Y, Chen Z-W, Wu C-M, Liao J-W, Chen T-H, Lee W-C, Yeh K-S, Hsuan S-L. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology* 2009; 135: 327-33.

Chiers K, Haesebrouck F, van Overbeke I, Charlier G, Ducatelle R. Early in vivo interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. *Veterinary Microbiology* 1999; 68: 301-6.

Chiers K, Van Overbeke I, Donné E, Baele M, Ducatelle R, De Baere T, Haesebrouck F. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsillar swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a dsbE-like gene. *Veterinary Microbiology* 2001; 83: 147-59.

Chiers K, Donné E, Van Overbeke I, Ducatelle R, Haesebrouck F. Evaluation of serology, bacteriological isolation and polymerase chain reaction for the detection of pigs carrying *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract after experimental infection. *Veterinary Microbiology* 2002a; 88: 385-92.

Chiers K, Donné E, Van Overbeke I, Ducatelle R, Haesebrouck F. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Veterinary Microbiology* 2002b; 85: 343-52.

Chiers K, De Waele T, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence

and induction of lesions in its porcine host. *Journal of Veterinary Research*. 2010; 41: 65-81.

Cho WS, Chae C. Expression of the apxIV Gene in Pigs Naturally Infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology* 2001; 125: 34-40.

Choi C, Kwon D, Min K, Chae C. In-situ hybridization for the detection of inflammatory cytokines (IL-1, TNF- α and IL-6) in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology* 1999; 121: 349-56.

Clapperton M, Bishop SC, Cameron ND, Glass EJ. Associations of acute phase protein levels with growth performance and with selection for growth performance in Large White pigs. *Animal Science* 2005; 81: 213-20.

Cole DJA, Duckworth JE, Holmes W, Cuthbertson A. Factors affecting voluntary feed intake in pigs. 3. The effect of a period of feed restriction, nutrient density of the diet and sex on intake, performance and carcass characteristics. *Animal Science* 1968; 10: 345-57.

Cöp WAG, Buiting GAJ. Feed intake in six lines of pigs and its influence on growth and carcass traits 1. Feeding twice daily for 20 min per session. *Animal Science* 1977; 25: 291-304.

Corthier G, Aynaud J-M, Galicher C, Gelfi J. Comparison of the immune response in serum and bucco-pharyngeal secretions following immunization by different routes with a live hog cholera virus vaccine (Thiverval strain). *Annals of Veterinary Research*. 1977: 159-65.

Costa G, Oliveira S, Torrison J, Dee S. Evaluation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* diagnostic tests using samples derived from experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology* 2011; 148: 246-51.

Costa G, Oliveira S, Torrison J. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in oral-fluid samples obtained from experimentally infected pigs. *Journal of Swine Health and Production* 2012; 20: 78-81.

Crujisen T, van Leengoed LAMG, Kamp EM, Bartelse A, Korevaar A, Verheijden JHM. Susceptibility to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs from an endemically infected herd is related to the presence of toxin-neutralizing antibodies. *Veterinary Microbiology* 1995; 47: 219-28.

Del Pozo Sacristán R, Michiels A, Martens M, Haesebrouck F, Maes D. Efficacy of vaccination against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in two Belgian farrow-to-finish pig herds with a history of chronic pleurisy. *Veterinary Record* 2014; 174: 302.

Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Journal of Periodontology* 2003; 31: 55-76.

Deneer HG, Potter AA. Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogenesis* 1989; 6: 425-32.

Devenish J, Rosendal S, Johnson R, Hubler S. Immunoserological comparison of 104-kilodalton proteins associated with hemolysis and cytolysis in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Pasteurella haemolytica*, and *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1989; 57: 3210-3.

Devenish J, Rosendal S, Bossé JT. Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 1990; 58: 3829-32.

Dietze K, Tucakov A, Engel T, Wirtz S, Depner K, Globig A, Kammerer R, Mouchantat S. Rope-based oral fluid sampling for early detection of classical swine fever in domestic pigs at group level. *BMC Veterinary Research* 2017; 13: 5.

Dottori M, Nigrelli A, Bonilauri P, Merialdi G, Gozio S, Cominotti F. Proposta per un nuovo sistema di punteggiatura delle pleuriti suine in sede di macellazione: La griglia SPES (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System). *Large Animal Review* 2007; 13: 161-5.

Dreyfus A, Schaller A, Nivollet S, Segers RPAM, Kobisch M, Mieli L, Soerensen V, Hüsey D, Miserez R, Zimmermann W, Inderbitzin F, Frey J. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Veterinary Microbiology* 2004; 99: 227-38.

Dron N, Doyle R, Jover-Hernandez M, Holyoake T. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs using pooled oral fluids. In: Honours Year Research Project 2012. Ed University CS, Melbourne, Australia.

Dubreuil JD, Jacques M, Mittal KR, Gottschalk M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Animal Health Research Reviews* 2000; 1: 73-93.

Eamens G, Gonsalves J, Whittington A-M, Turner B. Serological responses to two serovar-independent ELISA antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Australian commercial pig herds. *Australian Veterinary Journal* 2008; 86: 465-72.

Eamens G, Gonsalves J, Whittington A-M, Turner B. Evaluation of serovar-independent ELISA antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs, following experimental challenge with *A. pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida*. *Australian Veterinary Journal* 2012; 90: 225-34.

Fablet C, Marois-Créhan C, Simon G, Grasland B, Jestin A, Kobisch M, Madec F, Rose N. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. *Veterinary Microbiology* 2012; 157: 152-63.

Fablet C, Renson P, Pol F, Dorenlor V, Mahé S, Eono F, Eveno E, Le Dimna M, Liegard-Vanhecke D, Eudier S, Rose N, Bourry O. Oral fluid versus blood sampling in group-housed sows and finishing pigs: Feasibility and performance of antibody detection for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary Microbiology* 2017; 204: 25-34.

Ferraz MES, Almeida HMS, Storino GY, Sonálio K, Souza MR, Moura CAA, Costa WMT, Lunardi L, Linhares DCL, de Oliveira LG. Lung consolidation caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* has a negative effect on productive performance and economic revenue in finishing pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 2020; 182: 105091.

Fittipaldi N, Broes A, Harel J, Kobisch M, Gottschalk M. Evaluation and field validation of PCR tests for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 5085-93.

Fraile L, Alegre A, López-Jiménez R, Nofrarías M, Segalés J. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *The Veterinary Journal* 2010; 184: 326-33.

Frey J, Bosse JT, Chang Y-F, Cullen JM, Fenwick B, Gerlach GF, Gygi D, Haesebrouck F, Inzana TJ, Jansen R, Kamp EM, Macdonald J, MacInnes JI, Mittal KR, Nicolet J, Rycroft AN, Segers RPAM, Smits MA, Stenbaek E, Struck DK, van den Bosch JF, Willson PJ, Young R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolytins, pleurotoxin and their genes. *Journal of General Microbiology* 1993; 139: 1723-8.

Frey J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends in Microbiology* 1995; 3: 257-61.

Frey J, Kuhnert P, Villiger L, Nicolet J. Cloning and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein belonging to the family of PAL lipoproteins. *Research in Microbiology* 1996; 147: 351-61.

Frey J. Detection, identification, and subtyping of *Actinobacillus*

pleuropneumoniae. In: PCR Detection of Microbial Pathogens. Sachse K, Frey J, eds. Clifton, NJ: Springer 2003: 87-95.

Gao B, Mohan R, Gupta RS. Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; 59: 234-47.

Gardner IA, Bossé JT, Sheldrake RF, Rosendal S, Johnson RP. Serological response to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 infection in a commercial pig herd. *Australian Veterinary Journal* 1991; 68: 349-52.

Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology* 2013; 133: 1-4.

Gerlach GF, Anderson C, Klashinsky S, Rossi-Campos A, Potter AA, Willson PJ. Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infection and Immunity* 1993; 61: 565-72.

Gimenez-Lirola LG, Jiang YH, Sun D, Hoang H, Yoon KJ, Halbur PG, Opriessnig T. Simultaneous detection of antibodies against Apx toxins ApxI, ApxII, ApxIII, and ApxIV in pigs with known and unknown *Actinobacillus pleuropneumoniae* exposure using a multiplexing liquid array platform. *Clinical and Vaccine Immunology* 2014; 21: 85-95.

Giménez-Lirola LG, Xiao C-T, Zavala M, Halbur PG, Opriessnig T. Improving ante mortem diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection. *Journal of Microbiological Methods* 2013; 92: 113-21.

González W, Giménez-Lirola LG, Holmes A, Lizano S, Goodell C, Poonsuk K, Sitthicharoenchai P, Sun Y, Zimmerman JJ. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIV toxin antibody in serum and oral fluid specimens from pigs inoculated under experimental conditions. *Journal of Veterinary Research* 2017; 61: 163-71.

Goodell CK, Prickett J, Kittawornrat A, Zhou F, Rauh R, Nelson W, O'Connell C, Burrell A, Wang C, Yoon K-J, Zimmerman JJ. Probability of detecting influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2 in individual pig nasal swabs and pen-based oral fluid specimens over time. *Veterinary Microbiology* 2013; 166: 450-60.

Gottschalk M, Altman E, Lacouture S, De Lasalle F, Dubreuil JD. Serodiagnosis of swine pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 7 and 4 using long-chain lipopolysaccharides. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1997; 61: 62-5.

Gottschalk M, Lebrun A, Lacouture S, Harel J, Forget C, Mittal KR. Atypical *Actinobacillus Pleuropneumoniae* isolates that share antigenic determinants with both serotypes 1 and 7. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2000; 12: 444-9.

Gottschalk M, Broes A, Mittal KR, Kobisch M, Kuhnert P, Lebrun A, Frey J. Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species? *Veterinary Microbiology* 2003; 92: 87-101.

Gottschalk M. The challenge of detecting herds sub-clinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *The Veterinary Journal* 2015; 206: 30-8.

Gottschalk M. Actinobacillosis. In: *Diseases of Swine*. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell 2019: 749-67.

Gozio S, Cominotti F, Bonilauri P, Dottori M, Poggiali L. The effect of Porcilis® APP on rearing results and slaughterhouse examinations in a typical heavy pig herd in northern Italy. In: *Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark 2006*: 303.

Gram T, Ahrens P. Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane

lipoprotein. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 443-8.

Gram T, Ahrens P, Andreasen M, Nielsen JP. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes - evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Veterinary Microbiology* 2000; 75: 43-57.

Große Beilage E, Nathues H, Grummer B, Hartung J, Kamphues J, Kietzmann M, Rohde J, Spindler B, Weissenböck H. Diagnostik, Prophylaxe und Therapie von Atemwegserkrankungen in Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand. Große Beilage E, Wendt M, eds. Stuttgart: UTB 2013: 257- 62.

Gruber AD, Hewicker-Trautwein M. Atmungsorgane. In: Spezielle Pathologie für die Tiermedizin. Baumgärtner W, Gruber AD, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 197-8.

Gupta RS. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 2000; 24: 367-402.

Haesebrouck F, Chiers K, Van Overbeke I, Ducatelle R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology* 1997; 58: 239-49.

Hernandez-Garcia J, Robben N, Magnée D, Eley T, Dennis I, Kayes SM, Thomson JR, Tucker AW. The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Porcine Health Management* 2017; 3: 7.

Hodinka RL, Nagashunmugam T, Malamud D. Detection of human immunodeficiency virus antibodies in oral fluids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1998; 5: 419-26.

Holmgren N, Lundeheim N, Wallgren P. Infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in fattening pigs.

Influence of piglet production systems and influence on production parameters. *Journal of Veterinary Medicine* 1999; 46: 535-44.

Hommeze J, Devriese LA. *Pasteurella aerogenes* Isolations from Swine. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin* 1976; 23: 265-8.

Hu D, Han H, Zhou R, Dong F, Bei W, Jia F, Chen H. Gold(III) enhanced chemiluminescence immunoassay for detection of antibody against ApxIV of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Analyst* 2008; 133: 768-73.

Hyun Y, Ellis M, Riskowski G, Johnson RW. Growth performance of pigs subjected to multiple concurrent environmental stressors. *Journal of Animal Science* 1998; 76: 721-7.

Inzana TJ, Mathison B. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infection and Immunity* 1987; 55: 1580-7.

Inzana TJ, Todd J, Ma J, Veit H. Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 kilodalton hemolysin in virulence and immunoprotection. *Microbial Pathogenesis* 1991; 10: 281-96.

Ito H. Development of a *cps*-based multiplex PCR for typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 5. *Journal of Veterinary Medical Science* 2010; 653-5.

Ito H, Sueyoshi M. Development of a multiplex polymerase chain reaction method for *cps* typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 2, 5, 7, and 15. *Japan Agricultural Research Quarterly* 2015; 49: 277-80.

Jacobson R. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *J Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 1998; 17: 469-86.

Jessing SG, Angen Ø, Inzana TJ. Evaluation of a Multiplex PCR Test for Simultaneous Identification and Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes 2, 5, and 6. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 4095-100.

Jirawattanapong P, Stockhofe-Zurwieden N, van Leengoed L, Binnendijk G, Wisselink HJ, Raymakers R, Cruijssen A, van der Peet-Schwering C, van Nes A, Nielen MJJoSH, Production. Efficacy of a subunit vaccine *Actinobacillus pleuropneumoniae* in an endemically infected swine herd. *Journal of Swine Health and Production* 2008; 16: 193-9.

Kamp EM, Popma JK, Anakotta J, Smits MA. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infection and Immunity* 1991; 59: 3079-85.

Kamp EM, Stockhofe-Zurwieden N, Van Leengoed L, Smits MA, immunity. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infection and Immunity* 1997; 65: 4350-4.

Kamphues J. Fütterung und Wasserversorgung von Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement in Schweinebeständen. Große Beilage E, Wendt M, eds. Stuttgart: UTB 2013: 92-116.

Kapas L, Hong L, Cady AB, Opp MR, Postlethwaite AE, Seyer JM, Krueger JM. Somnogenic, pyrogenic, and anorectic activities of tumor necrosis factor- α and TNF- α fragments. *American Journal of Physiology* 1992; 263: R708-R15.

Kittawornrat A, Prickett J, Wang C, Olsen C, Irwin C, Panyasing Y, Ballagi A, Rice A, Main R, Johnson J, Rademacher C, Hoogland M, Rowland R, Zimmerman J. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2012; 24: 262-9.

Klasing KC, Laurin DE, Peng RK, Fry DM. Immunologically mediated growth

depression in chicks: influence of feed intake, corticosterone and interleukin-1. *The Journal of Nutrition* 1987; 117: 1629-37.

Klausen J, Ekeröth L, Grøndahl-Hansen J, Andresen LO. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus Pleuropneumoniae* serovar 7 in pig serum. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2007; 19: 244-9.

Klinkenberg D, Tobias TJ, Bouma A, van Leengoed LAMG, Stegeman JA. Simulation study of the mechanisms underlying outbreaks of clinical disease caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in finishing pigs. *The Veterinary Journal* 2014; 202: 99-105.

Krejci J, Nechvatalova K, Kudlackova H, Faldyna M, Kucerova Z, Toman M. Systemic and local antibody responses after experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in piglets with passive or active immunity. *Journal of Veterinary Medicine* 2005; 52: 190-6.

Kristensen CS, Andreasen M, Ersbøll AK, Nielsen JP. Antibody response in sows and piglets following vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae*, toxigenic *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2004a; 68: 66-70.

Kristensen CS, Angen Ø, Andreasen M, Takai H, Nielsen JP, Jorsal SE. Demonstration of airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 between simulated pig units located at close range. *Veterinary Microbiology* 2004b; 98: 243-9.

Kuhnert P, Heyberger-Meyer B, Nicolet J, Frey J. Characterization of PaxA and its operon: a cohemolytic RTX toxin determinant from pathogenic *Pasteurella aerogenes*. *American Society for Microbiology Journals* 2000; 68: 6-12.

Kuhnert P, Schlatter Y, Frey J. Characterization of the type I secretion system of the RTX toxin ApxII in "*Actinobacillus porcitosillarum*". *Veterinary Microbiology* 2005; 107: 225-32.

Kukla A. Foundations of an attributional theory of performance. *Journal Psychological Review* 1972; 79: 454.

Lee C, Giles LR, Bryden WL, Downing JL, Owens PC, Kirby AC, Wynn PC. Performance and endocrine responses of group housed weaner pigs exposed to the air quality of a commercial environment. *Livestock Production Science* 2005; 93: 255-62.

Liggett AD, Harrison LR, Farrell RL. Sequential study of lesion development in experimental haemophilus pleuropneumonia. *Research in Veterinary Science* 1987; 42: 204-12.

Liu J, Chen X, Tan C, Guo Y, Chen Y, Fu S, Bei W, Chen H. In vivo induced RTX toxin ApxIVA is essential for the full virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 2009; 137: 282-9.

Lo TM, Ward CK, Inzana TJ. Detection and Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 5 by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 1704-10.

Loftager MK, Eriksen L, Aasted B, Nielsen R. Protective immunity following immunisation of pigs with aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Research in Veterinary Science* 1993; 55: 281-6.

Loynachan AT, Pettigrew JE, Wiseman BS, Kunkle RA, Harris DL. Evaluation of a diet free of animal protein in germfree swine. 2005; 12: 149-55.

Madec F, Kobisch M. Bilan lésionnel des poumons de porcs charcutiers à l'abattoir. *Journées de la Recherche Porcine* 1982; 14: 405-12.

Madonia JV, Bahn AN, Calandra JC. Salivary excretion of Coxsackie b-1 virus in rabbits. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 1966; 14: 394-6.

Maes D, Chiers K, Haesebrouck F, Laevens H, Verdonck M, Res. AdKJV. Herd

factors associated with the seroprevalences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. *Veterinary Research* 2001; 32: 409-19.

Maier E, Reinhard N, Benz R, Frey J. Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 1996; 64: 4415-23.

Maldonado J, Valls L, Martínez E, Riera P. Isolation rates, serovars, and toxin genotypes of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Actinobacillus Pleuropneumoniae* among pigs suffering from pleuropneumonia in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2009; 21: 854-7.

Maldonado J, Blanco M, Martínez E, Navas J. Comparison of three typing assays for nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2011; 23: 812-6.

Marois C, Gottschalk M, Morvan H, Fablet C, Madec F, Kobisch M. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 2009; 135: 283-91.

Matthews PRJ, Pattison IH. The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 1961; 71: 44-52.

Merialdi G, Dottori M, Bonilauri P, Luppi A, Gozio S, Pozzi P, Spaggiari B, Martelli P. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *The Veterinary Journal* 2012; 193: 234-9.

Meyns T, Van Steelant J, Rolly E, Dewulf J, Haesebrouck F, Maes D. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *The Veterinary Journal* 2011; 187: 388-92.

Montaraz JA, Fenwick B, Hill H, Rider M. Evaluating antibody isotype-specific ELISA, complement fixation, and Apx 1 hemolysin neutralization tests to detect serum antibodies in pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Swine Health Production* 1996; 4: 79.

Moral CH, Soriano AC, Sánchez Salazar M, Marcos JY, Ramos SS, Carrasco GN. Molecular Cloning and Sequencing of the *aroA* Gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its use in a PCR Assay for Rapid Identification. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 1575-8.

Morrison SR, Heitman H, Bond TE. Effect of humidity on swine at temperatures above optimum. *International Journal of Biometeorology* 1969; 13: 135-9.

Mousing J, Lybye H, Barfod K, Meyling A, Rønsholt L, Willeberg P. Chronic pleuritis in pigs for slaughter: an epidemiological study of infectious and rearing system-related risk factors. *Preventive Veterinary Medicine* 1990; 9: 107-19.

Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 1990; 262: 56-65.

Mur L, Gallardo C, Soler A, Zimmermann J, Pelayo V, Nieto R, Sánchez-Vizcaíno JM, Arias M. Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever. *Veterinary Microbiology* 2013; 165: 135-9.

Mylrea PJ, Fraser G, Macqueen P, Lambourne DA. Pleuropneumonia in pigs caused by *Haemophilus parahaemolyticus*. *Australian Veterinary Journal* 1974; 50: 255-9.

Narita M, Kawashima K, Morozumi T, Takashima H. Effect of physical defenses of the respiratory tract on the development of pneumonia in pigs inoculated endobronchially with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Veterinary Medical Science* 1995; 57: 839-44.

Narita M, Kawashima K, Nakagawa H, Uchimura A, Ohashi T, Kimura K,

Tanimura N. Immunohistopathological characterization of pig pneumonia caused by a combined Aujeszky's disease virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Journal of Comparative Pathology* 1997; 117: 25-33.

Nathues H, Grummer B, Rohde J, Große Beilage E. Labordiagnostik an Probenmaterial aus Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement in Schweinebeständen. Große Beilage E, Wendt M, eds. Stuttgart: UTB 2013: 133- 49.

Naushad HS, Gupta RS. Molecular signatures (conserved indels) in protein sequences that are specific for the order Pasteurellales and distinguish two of its main clades. *Antonie van Leeuwenhoek* 2012; 101: 105-24.

Neto JCG, Strait EL, Raymond M, Ramirez A, Minion FC. Antibody responses of swine following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* and *M. flocculare*. *Veterinary Microbiology* 2014; 174: 163-71.

Neto JCG, Bower L, Erickson BZ, Wang C, Raymond M, Strait EL. Quantitative real-time polymerase chain reaction for detecting *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in pen-based oral, tonsillar, and nasal fluids. *Journal of Veterinary Science* 2015; 16: 195-201.

Nickoll I. Porzines Circovirus Typ 2 (PCV2)-Infektionen in oberbayerischen Schweinemastbeständen mit routinemäßiger Impfung gegen PCV2 und deren Bedeutung für das Auftreten von Lungenveränderungen. Diss. med. vet. 2018. Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Nielsen R, Andresen LO, Plambeck T. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1 strains antigenically related to both serotypes 2 and 7. *Acta veterinaria Scandinavica* 1996; 37: 327-36.

Nielsen R, Andresen LO, Plambeck T, Nielsen JP, Krarup LT, Jorsal SE. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Veterinary Microbiology* 1997; 54: 35-46.

Nielsen R, van den Bosch JF, Plambeck T, Sørensen V, Nielsen JP. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 2000; 71: 81-7.

O'Neill C, Jones SCP, Bossé JT, Watson CM, Williamson SM, Rycroft AN, Kroll JS, Hartley HM, Langford PR. Population-based analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIVA for use as a DIVA antigen. *Vaccine* 2010; 28: 4871-4.

Opriessnig T, Hemann M, Johnson JK, Heinen S, Giménez-Lirola LG, O'Neill KC, Hoang H, Yoon K-J, Gottschalk M, Halbur PG. Evaluation of diagnostic assays for the serological detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on samples of known or unknown exposure. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2013; 25: 61-71.

Osaki M, Sato Y, Tomura H, Ito H, Sekizaki T. Genetic diversity of the genes encoding the outer membrane lipoprotein (omlA) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Veterinary Medical Science* 1997; 59: 213-5.

Pagot E, Pommier P, Keïta A. Relationship between growth during the fattening period and lung lesions at slaughter in swine. *Revue de médecine vétérinaire* 2007; 158: 253.

Palzer A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritzi K. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Veterinary Record* 2008; 162: 267-71.

Panyasing Y, Goodell CK, Giménez-Lirola L, Kittawornrat A, Wang C, Schwartz KJ, Zimmerman JJ. Kinetics of influenza A virus nucleoprotein antibody (IgM, IgA, and IgG) in serum and oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions. *Vaccine* 2013; 31: 6210-5.

Pattison IH, Howell DG, Elliot J. A haemophilus-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 1957; 67: 320-37.

Perry MB, Altman E, Brisson J-R, Beynon LM, Richards JC. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* strains. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease* 1990; 4: 299-308.

Perry MB, MacLean LL, Vinogradov E. Structural characterization of the antigenic capsular polysaccharide and lipopolysaccharide O-chain produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15. *Biochemistry and Cell Biology* 2005; 83: 61-9.

Perry MB, Angen Ø, MacLean LL, Lacouture S, Kokotovic B, Gottschalk M. An atypical biotype I *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13 is present in North America. *Veterinary Microbiology* 2012; 156: 403-10.

Pieters MG, Maes D. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Swine*. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell 2019: 863-83.

Pohl S, Bertschinger HU, Frederiksen W, Mannheim W. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-Like Organism Causing Porcine Necrotic Pleuropneumonia to the Genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the Basis of Phenotypic and Desoxyribonucleic Acid Relatedness. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1983; 33: 510-4.

Pomorska-Mól M, Dors A, Kwit K, Kowalczyk A, Stasiak E, Pejsak Z. Kinetics of single and dual infection of pigs with swine influenza virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 2017; 201: 113-20.

Prickett J, Simer R, Christopher-Hennings J, Yoon K-J, Evans RB, Zimmerman JJ. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2008a; 20: 156-63.

Prickett JR, Kim W, Simer R, Yoon K-J, Zimmerman JJ. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *Journal of Swine Health and Production* 2008b; 16: 86-91.

Prickett JR, Zimmerman JJ. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Animal Health Research Reviews* 2010; 11: 207-16.

Prickett JR, Johnson J, Murtaugh MP, Puvanendiran S, Wang C, Zimmerman JJ, Opriessnig T. Prolonged detection of PCV2 and anti-PCV2 antibody in oral fluids following experimental inoculation. *Transboundary and Emerging Disease* 2011; 58: 121-7.

Puy CL. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Journal of Medicina Oral Patologia Oral Cirugia Bucal* 2006; 11: 449-55.

Radacovici S, Lallier R, Lariviere S, Dubreuil JD. Biochemical characterization of an antigenic saline extract of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 and identification of a serotype-specific antigen for ELISA serodiagnosis. *Veterinary Microbiology* 1992; 30: 369-85.

Ramjeet M, Deslandes V, Gouré J, Jacques M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. *Animal Health Research Reviews* 2008; 9: 25-45.

Ramos-Vara JA, Wu CC, Mitsui I, Lin TL, Miller MA. Metritis, valvular endocarditis, and septicemia by *Actinobacillus equuli* in a gilt in the United States. *Veterinary Pathology* 2008; 45: 495-9.

Rapp VJ, Ross RF. Antibody response of swine to outer membrane components of *Haemophilus pleuropneumoniae* during infection. *Infection and Immunity* 1986; 54: 751-60.

Rayamajhi N, Shin SJ, Kang SG, Lee DY, Ahn JM, Yoo HS. Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2005; 17: 359-62.

Reiner G. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: *Krankes Schwein - kranker Bestand*. Reiner G, ed. Stuttgart: Eugen Ulmer KG 2015: 121-4.

Renken C. Seroprävalenz von *Actinobacillus pleuropneumoniae* sowie zugehöriger Serotypen und Vorkommen von Pleuritiden bei Mastschweinen aus Beständen mit klinischen Anzeichen einer Atemwegserkrankung. Diss. med. vet. 2017. Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Rioux S, Girard C, Dubreuil JD, Jacques M. Evaluation of the protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 detoxified lipopolysaccharides or O-polysaccharide-protein conjugate in pigs. *Research in Veterinary Science* 1998; 65: 165-7.

Rodríguez-Barbosa JI, Gutiérrez Martín CB, Tascón RI, González OR, Mittal KR, Rodríguez Ferri EF. Characterization of monoclonal antibodies that recognize common epitopes located on O antigen of lipopolysaccharide of serotypes 1, 9 and 11 of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Pathogens and Disease* 1996; 16: 173-81.

Rohrbach BW, Hall RF, Hitchcock JP. Effect of subclinical infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in commingled feeder swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1993; 202: 1095-8.

Rosendal S, Mitchell WR. Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: a survey of Ontario Pork Producers. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1983; 47: 1-5.

Rosendal S, Boyd DA, Gilbride KA. Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1985; 49: 68-74.

Rossi CC, Pereira MF, Langford PR, Bazzolli DMS. A BOX-SCAR fragment for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* 2014; 352: 32-7.

Sárközi R, Makrai L, Fodor L. Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus Pleuropneumoniae*: Serovar 16. *Acta Veterinaria Hungarica* 2015; 63: 444-50.

Sassu EL, Bossé JT, Tobias TJ, Gottschalk M, Langford PR, Hennig-Pauka I. Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae* —knowledge, gaps and challenges. *Transboundary and Emerging Disease* 2018; 65: 72-90.

Šatrán P, Nedbalcová K, Kučerová Z. Comparison of protection efficacy of toxoid and whole-cell vaccines against porcine pleuropneumonia caused by endotracheal infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Acta Veterinaria Brno* 2003; 72: 213-9.

Savoye C, Jobert JL, Berthelot-Hérault F, Keribin AM, Cariolet R, Morvan H, Madec F, Kobisch M. A PCR assay used to study aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from samples of live pigs under experimental conditions. *Veterinary Microbiology* 2000; 73: 337-47.

Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, Nicolet J, Anderson TJ, MacInnes JJ, Segers RP, Frey J. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 1999; 145: 2105-16.

Schaller A, Kuhnert P, de la Puente-Redondo VA, Nicolet J, Frey J. Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. *Veterinary Microbiology* 2000; 74: 365-76.

Schaller A, Djordjevic SP, Eamens GJ, Forbes WA, Kuhn R, Kuhnert P, Gottschalk M, Nicolet J, Frey J. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA. *Veterinary Microbiology* 2001; 79: 47-62.

Schuchert JA, Inzana TJ, Angen Ø, Jessing S. Detection and Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes 1, 2, and 8 by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 4344-8.

Sebunya TN, Saunders JR, Osborne AD. Dose response relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* aerosols in pigs. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1983; 47: 54-6.

Serebrin S, Rosendal S, Valdivieso-Garcia A, Little PB. Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Research in Veterinary Science* 1991; 50: 18-22.

Serrano-Rubio LE, Tenorio-Gutiérrez V, Suárez-Güemes F, Reyes-Cortés R, Rodríguez-Mendiola M, Arias-Castro C, Godínez-Vargas D, de la Garza M. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovars 1 and 2 in pigs using a PCR assay. *Molecular and Cellular Probes* 2008; 22: 305-12.

Sheng Z, Han H, Hu D, Liang J, He Q, Jin M, Zhou R, Chen H. Quantum dots-gold(iii)-based indirect fluorescence immunoassay for high-throughput screening of APP. *Chemical Communications* 2009: 2559-61.

Shin M-K, Kang ML, Cha SB, Lee W-J, Sung JH, Yoo HS. An immunosorbent assay based on the recombinant ApxIa, ApxIIa, and ApxIIIa toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its application to field sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2011; 23: 736-42.

Shope RE. Porcine contagious pleuropneumonia.I. Experimental transmission, etiology, and pathology. *J Exp Med* 1964; 119: 357-68.

Sidibe M, Messier S, Lariviere S, Gottschalk M, Mittal KR. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1993; 57: 204- 8.

Sidler X, Eichhorn J, Geiser V, Bürgi E, Schüpbach G, Overesch G, Stephan R,

Schmitt S, Hässig M, Sydler T. Lung and pleural lesions before and after implementation of a national eradication program against enzootic pneumonia and actinobacillosis as well as changes of slaughter carcass organs in slaughter pigs in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 2015; 157: 665-73.

Sjölund M, Zoric M, Persson M, Karlsson G, Wallgren P. Disease patterns and immune responses in the offspring to sows with high or low antibody levels to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Research in Veterinary Science* 2011; 91: 25-31.

Sorensen NS, Tegtmeier C, Andresen LO, Piñeiro M, Toussaint MJM, Campbell FM, Lampreave F, Heegaard PMH. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; 113: 157-68.

Sthitmatee N, Sirinarumitr T, Makonkewkeyoon L, Sakpuaram T, Tesaprateep T. Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-*apx* genes. *Molecular and Cellular Probes* 2003; 17: 301-5.

Szancer J. Attempts to eradicate some respiratory and enteric pathogens in Danish pig farms. Italy: Novartis, Animal Health Denmark 2008: <http://www.gruppoveterinariosuicolomantovano.it/documenti/Szancer.pdf>. 03.05.2020.

Tascón RI, Vázquez-Boland JA, Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Barbosa I, Rodríguez-Ferri EF. The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Molecular Microbiology* 1994; 14: 207-16.

Tegetmeyer HE, Jones SCP, Langford PR, Baltes N. ISAp11, a novel insertion element of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, prevents ApxIV-based serological detection of serotype 7 strain AP76. *Veterinary Microbiology* 2008; 128: 342-53.

Tenovuo J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Journal of Community Dentistry and Oral*

Epidemiology 1997; 25: 82-6.

Thomé H. Mundhöhle und Schlundkopf. In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Frewein J, Gasse H, Leiser R, Roos H, Thomé H, Vollmerhaus B, Waibl H, eds. Berlin: Parey Buchverlag Berlin 1999: 19-102.

Tobias TJ, Bouma A, Klinkenberg D, Daemen AJJM, Stegeman JA, Wagenaar JA, Duim B. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs by real-time quantitative PCR for the *apxIVA* gene. The Veterinary Journal 2012; 193: 557-60.

Tobias TJ, Bouma A, Daemen AJJM, Wagenaar JA, Stegeman A, Klinkenberg D. Association between transmission rate and disease severity for *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. Veterinary Research 2013; 44: 2.

Tobias TJ, Bouma A, van den Broek J, van Nes A, Daemen AJJM, Wagenaar JA, Stegeman JA, Klinkenberg D. Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* among weaned piglets on endemically infected farms. Preventive Veterinary Medicine 2014; 117: 207-14.

Tumamao J, Bowles R, van den Bosch H, Klaasen H, Fenwick B, Blackall P. An evaluation of the role of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1 and 15 in the protection provided by sub-unit and live streptomycin-dependent pleuropneumonia vaccines. Australian Veterinary Journal 2004a; 82: 773-80.

Tumamao J, Bowles R, van den Bosch H, Klaasen H, Fenwick B, Storie G, Blackall P. Comparison of the efficacy of a subunit and a live streptomycin-dependent porcine pleuropneumonia vaccine. Australian Veterinary Journal 2004b; 82: 370-4.

Ueda Y, Ohtsuki S, Narukawa N. Efficacy of florfenicol on experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. Journal of Veterinary Medical Science 1995; 57: 261-5.

van de Kerkhof A, Haesebrouck F, Chiers K, Ducatelle R, Kamp EM, Smits MA. Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine alveolar epithelial cells. *Infection and Immunity* 1996; 64: 3905-7.

van den Bosch H, Frey J. Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs. *Vaccine* 2003; 21: 3601-7.

van Dixhoorn IDE, Reimert I, Middelkoop J, Bolhuis JE, Wisselink HJ, Groot Koerkamp PWG, Kemp B, Stockhofe-Zurwieden N. Enriched Housing Reduces Disease Susceptibility to Co-Infection with Porcine Reproductive and Respiratory Virus (PRRSV) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) in Young Pigs. *PLOS ONE* 2016; 11: e0161832.

van Leengoed LA, Kamp EM. A method for bronchoalveolar lavage in live pigs. *Veterinary Quarterly* 1989; 11: 65-72.

Van Ostaaijen J, Frey J, Rosendal S, MacInnes JI. *Actinobacillus suis* strains isolated from healthy and diseased swine are clonal and carry *apxICABDvar. suis* and *apxIICAv. suis* toxin genes. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35: 1131-7.

van Overbeke I, Chiers K, Charlier G, Vandenberghe I, Beeumen JV, Ducatelle R, Haesebrouck F. Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 2002; 88: 59-74.

Velthuis AGJ, De Jong MCM, Stockhofe N, Vermeulen TMM, Kamp EM. Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs is characterized by variation in infectivity. *Epidemiology and Infection* 2002; 129: 203-14.

Velthuis AGJ, De Jong MCM, Kamp EM, Stockhofe N, Verheijden JHM. Design and analysis of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* transmission experiment. *Preventive Veterinary Medicine* 2003; 60: 53-68.

Verhaagh M, Deblitz C (2019) Wirtschaftlichkeit der Alternativen zur betäubungslosen Ferkelkastration–Aktualisierung und Erweiterung der betriebswirtschaftlichen Berechnungen, <https://ageconsearch.umn.edu/record/287200>

Vigre H, Angen Ø, Barfod K, Lavritsen DT, Sørensen V. Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions: emphasis on tonsillar colonisation and passively acquired colostral antibodies. *Veterinary Microbiology* 2002; 89: 151-9.

Vigre H, Ersbøll AK, Sørensen V. Decay of acquired colostral antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *Journal of Veterinary Medicine* 2003; 50: 430-5.

Wei B, Li F, Yang H, Yu L, Zhao K, Zhou R, Hu Y. Magnetic beads-based enzymatic spectrofluorometric assay for rapid and sensitive detection of antibody against ApxIVA of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biosensors and Bioelectronics* 2012; 35: 390-3.

Welch RA. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology* 1991; 5: 521-8.

Wendt M, Epe C, Grummer B, Kamphues J, Kietzmann M, Rohde J, Weissenböck H. Diagnostik, Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen des Verdauungstraktes in Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement in Schweinebeständen. Große Beilage E, Wendt M, eds. Stuttgart: Eugen Ulmer 2013: 271-349.

Xiao G, Cao S, Huang X, Wen X. DNA microarray-based identification and typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res* 2009; 73: 190-9.

Yaeger MJ, Van Alstine WG. Respiratory System. In: Diseases of Swine, 12th edn. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. West Sussex: Wiley-Blackwell 2019: 393-407.

Yagihashi T, Nunoya T, Mitui T, Tajima M. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* Infection on the development of *Haemophilus pleuropneumoniae* Pneumonia in pigs. The Japanese Journal of Veterinary Science 1984; 46: 705-13.

Zhou L, Jones SCP, Angen Ø, Bossé JT, Nash JHE, Frey J, Zhou R, Chen HC, Kroll JS, Rycroft AN, Langford PR. Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross-reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. Journal of Clinical Microbiology 2008; 46: 800-3.

XI. ANHANG

1. Nachweise aus der Routinediagnostik

1.1. Betrieb A

Material: Bakt. Feldisolate/-stämme/-kulturen

Ziel: **Apx-Typisierung mittels Multiplex-PCR**

Untersuchungsnummer	Identifikation	Apx-Toxin-Typ der Serotypen
	App 48 kg Mastschwein	1, 9, 11

Material: Bakt. Feldisolate/-stämme/-kulturen

Ziel: **Apx-Typisierung mittels Multiplex-PCR / Subkultur für Typisierung**

Untersuchungsnummer	Identifikation	
	App 48 kg Mastschwein	erfolgt

Resistenz-/Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Isolaten mittels Agardiffusi

Identifikation	App 48 kg Mastschwein
U-Nr.	
Erreger	Actinobacillus pleuropneumoniae
Wirkstoff	
Amoxicillin/Clavulansäure	S
Ampicillin	S
Cefquinom	S
Ceftiofur	S
Enrofloxacin	S
Florfenicol	S
Gentamicin	n
Neomycin	n
Penicillin G	S
Tetracyclin	S
Tiamulin	S
Tilmicosin	S
Tulathromycin	S
Trimethoprim/Sulfa.	S

Interpretation:

S: Interpretation gemäß CLSI bzw. vollständige Hemmung des Erregerwachstums

I: ausschließliche Interpretation gemäß CLSI

R: Interpretation gemäß CLSI bzw. fehlende Hemmung des Erregerwachstums

n: nicht auswertbar

Die Interpretation von Cefquinom erfolgt gemäß der Angaben des Herstellers.
Die Resistenzprüfung erfolgte außerhalb des akkreditierten Bereiches.

1.2. Betrieb B

Material: Bakt. Feldisolate/-stämme/-kulturen

Ziel: **Subkultur**

Untersuchungsnummer	Identifikation	
	haemophile Species, Lungentupfer (Sektion)	erfolgt

Material: Bakt. Feldisolate/-stämme/-kulturen

Ziel: **Identifizierung von *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) mittels PCR**

Untersuchungsnummer	Identifikation	Spezifischer PCR-Nachweis von:
	haemophile Species, Lungentupfer (Sektion)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (App)

Material: Bakt. Feldisolate/-stämme/-kulturen

Ziel: **Apx-Typisierung mittels Toxin-Multiplex-PCR**

Untersuchungsnummer	Identifikation	Apx-Toxin-Typ der Serotypen
	haemophile Species, Lungentupfer (Sektion)	7, 2

Material: Bakt. Feldisolate/-stämme/-kulturen

Ziel: **Apx-Typisierung mittels Toxin-Multiplex-PCR / Differenzierung der App-Serotypen 2, 5 und 6 mittels PCR**

Untersuchungsnummer	Identifikation	PCR / App-Serotyp (2/5/6)
	haemophile Species, Lungentupfer (Sektion)	durch Ausschluß Identifikation von Serotyp 7

:: Act. pleuropn. (APP) - Antikörper, Screening

ELISA Id-Vet

B69

Lfd. Nr.	Kennzeichnung	positiv ≥ 30	fraglich 25 - 30	negativ < 25
1000411163	Abteil 12, abgesetzt 29.05.18	37,93		
1000411164	Abteil 12, abgesetzt 29.05.18	80,21		
1000411165	Abteil 12, abgesetzt 29.05.18			3,81
1000411166	Abteil 13, abgesetzt 29.05.18			11,28
1000411167	Abteil 13, abgesetzt 29.05.18	46,54		
1000411168	Abteil 17, abgesetzt 05.06.18			11,13
1000411169	Abteil 17, abgesetzt 05.06.18	49,11		
1000411170	Abteil 17, abgesetzt 05.06.18	31,13		
1000411171	Abteil 18, abgesetzt 05.06.18		26,73	
1000411172	Abteil 18, abgesetzt 05.06.18			13,65

Kreuzreaktionen möglich!

:: Act. pleuropn. (APP) - Antikörper

ELISA IDXX ApxIV

L741

Lfd. Nr.	Kennzeichnung	positiv ≥ 50	fraglich 40 - 50	negativ < 40
1000411163	Abteil 12, abgesetzt 29.05.18	67		
1000411164	Abteil 12, abgesetzt 29.05.18	56		
1000411167	Abteil 13, abgesetzt 29.05.18	74		
1000411169	Abteil 17, abgesetzt 05.06.18			37

:: APP-Antikörper Serotypisierung

ELISA Id-Vet

Lfd. Nr.	1/9/11	2	3/6/8	4/7	5a,b	10	12
1000411163	negativ	negativ	positiv !	negativ	negativ	negativ	negativ
1000411167	negativ	negativ	positiv !	fraglich	negativ	negativ	negativ

2. BioChek APP qPCR Test

Actinobacillus pleuropneumoniae qPCR test kit*



BioChek swine qPCR assays

Product Number: SP104

Description of test

The App qPCR multiplex test kit will detect the presence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* via the toxins App can produce: Apx IV and/or Apx I and/or Apx III in extracts from oral fluids, nasal swabs or tissue. Primers and probes are specific for toxins Apx IV, Apx I and Apx III; each probe is labelled with a specific fluorophore which is detected in a designated channel on the qPCR thermocycler. After extraction of the DNA, samples are added to plates along with the dedicated Reaction Mix. The prepared wells are placed in the qPCR cycle for amplification and detection.

Table 1) App toxins and serotypes

Toxin	Formed by serotype
Apx IV	all serotypes
Apx I	10 + 14
Apx III	2,3,4,6,8,15

Method used

qPCR.

The App qPCR multiplex assay enables the simultaneous detection of:

- *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Apx IV); detected in FAM channel
- Apx I; detected in Cy-5 channel
- Apx III; detected in Texas Red channel
- Internal control (IC); detected in HEX channel

Reagents and materials provided:

1. Yellow cap. App Primer/Probe mix with Internal Control (PP/IC), 2 vials, liquid (412.5 µl)
2. Black Cap. Mastermix, 2 vials, liquid (675 µl)
3. Blue Cap. qPCR Negative Control (qPCR NC), 4 vials, molecular grade water (60 µl)
4. Red Cap. App qPCR Positive Control (App PC), 2 vials, diluted App and vtaA10 plasmid with cloned target sequence standardised to represent significant amounts of App and vtaA10 target (60 µl)

Storage Conditions: Upon receipt, store at -20 °C (+/- 5 °C)

Materials and Equipment required (not provided with kit):

- qPCR thermocycler (detection channels for FAM, Texas Red and CY-5)
- Heating block (optional)
- Vortex mixer (x2)
- Mini-centrifuge (x2)
- PCR plate-spinner
- Pipettes & disposable filter-tips for volumes of 1 – 1000 µl
- Single, 8 or 12 channel pipette
- DNase/RNase free tubes for preparation of reaction mix
- Plates, strips (+caps) or microtubes for DNA extraction
- Plates for PCR reaction (suitable for use with your qPCR thermocycler)
 - Recommended plates:
 - Biorad CFX: Biorad Premium hard shell: Biorad cat. no HSP9645
 - ABI 7500: Microamp Optical 96 well: Thermo Fisher cat. no N8010560
 - Agilent MX3005P: 96 wells polypropylene plates: Agilent cat. no 410088
- Heat resistant sealers for plate
- Disposable powder free gloves
- Refrigerator and freezer

*For veterinary research only.

Warnings and Precautions

1. Wear disposable powder free gloves at any stage of running the assay and/or sample preparation.
2. Handle all reagents with care.
3. Treat all biological materials as potentially biohazardous, including all field samples.
4. **NEVER** pipette anything by mouth. There should be no eating, drinking or smoking in areas designated for using kit reagents and handling field samples.
5. This kit is for *in vitro* use only.
6. Strict adherence to the test protocol will lead to achieving best results.
7. Dedicate one airspace for kit storage/reagent preparation (Room 1, clean room) and another airspace (Room 2) for running the assay and sample preparation. A third airspace is optional (Room 3) for dedicated PCR amplification/running the assay.
8. **NEVER** move **ANY** materials from Room 2 or 3 to Room 1.
9. Decontaminate PCR laboratories with bleach (or alternative DNA decontaminant) and UV light (optional) after testing.
10. Assays should be performed by qualified laboratory personnel only.

Recommended Work Flow Protocol

When running complete assay including DNA extraction in 1 day

1. Start in Room 1 with reagent preparation.
2. Go to Room 2 for DNA extraction and running assay.
3. Never go from room 2/3 to Room 1 during the same day.

When doing DNA extraction first

Day 1

1. Start in Room 2 with DNA extraction.

Day 2

1. Start in Room 1 with reagent preparation.
2. Go to Room 2/3 for running the assay.
3. Never go from Room 2/3 to Room 1 during the same day.

Preparation of samples:

DNA extraction from sample (e.g. oral fluid, laryngeal swabs, lung tissue samples etc.), any approved manual or automated method can be used.

Test protocol App qPCR:**Reagent preparation****Room 1:**

1. Thaw the Mastermix, PP/IC mix and the NC. This can be done at room temperature (18-28°C)
2. Calculate the required volumes of Mastermix and Primer/Probe mix with Internal Control (Reaction Mix):
 - Mastermix: 12.5 µl/well
 - Primer/Probe mix with Internal Control: 7.5 µl/well
 - Prepare number of samples (including controls) +1
3. Add calculated volume of Mastermix to calculated volume of Primer/Probe mix with Internal Control and vortex. This will now be referred to as Reaction Mix. If the prepared Reaction Mix is not used immediately, store the Reaction Mix at 2-8 °C until use in Room 2. You can store the Reaction Mix for up to 4 hours at 2-8 °C.

Example:

Reaction Mix for 24 wells: (25 x 12.5 µl) = 312.5 µl Mastermix and (25 x 7.5 µl) = 187.5 µl Primer/Probe mix with Internal Control. Note: the total volume of this example will be 500 µl (25 x 20 µl).

Assay preparation:**Room 1:**

1. Take a suitable qPCR plate and record location of samples on template.
2. Add 20 µl of Reaction Mix as prepared above for every sample. The plate does not need to be cooled.
3. Add 5 µl of Negative Control into well XX. This is a reagent and environment control.
4. Cover the wells before moving to Room 2.

DNA amplification:**Room 2:**

1. Add 5 µl of Positive Control into well YY, the plate does not need to be cooled.
2. Add 5 µl of Negative Control into well ZZ. This is an environment control.
3. Add 5 µl of DNA extract into the appropriate wells. Cover plate with heat resistant sealer.
4. Spin plate for 30-60 seconds at 200-1000 x g.
5. Place plate in qPCR thermocycler and run using the specified thermal cycler program.

Thermal cycler program for plate type thermocyclers:**qPCR program at normal ramp speed, do not use FAST mode if available.**

1 x 3 min 95 °C
 40 cycles of 15 sec 95 °C / 60 sec 60 °C
 N.B. 60 sec 60 °C is the data collection point.

Select the reporter dyes:

FAM = *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Apx IV)
 CY-5 = Apx I
 TEXAS RED = Apx III
 IC = HEX

Alternative channel names for the reporter dyes:

FAM: FAM only
 TEXAS RED: Texas Red only
 CY-5: Quasar 670
 HEX : VIC

The run will take approximately 1.5 hours.

When the run is finished, remove the plate from the qPCR instruments and discard it without removing the seal.

Validation and interpretation:**Analysis and threshold settings:**

BioRad CFX96:	Lifetech ABI-7500:	Agilent Mx3005P:
Fluorescence drift correction: Yes	Passive reference : No	Amplification-based threshold
Cycles to analyse: 5 – 40	Baseline cycles: 3 – 15	Adaptive baseline
Threshold settings:	Threshold settings:	Threshold settings:
FAM: 100 (RFU)	FAM: 70000 (RFU)	FAM: 1000 (RFU)
TEXAS RED: 100 (RFU)	Texas Red: 10000 (RFU)	TEXAS RED: 250 (RFU)
CY-5: 100 (RFU)	CY-5: 10000 (RFU)	CY-5: 500 (RFU)

Settings on other qPCR machines or when using different types of plates or strips (not recommended) can be different.

Validation of assay run:

- Positive control will show a Cq value for the Apx IV in the FAM channel between 22.0 – 30.0
 If the positive control for Apx IV has a Cq <22.0 or >30.0 the test is invalid for Apx IV.
- Positive control will show a Cq value for the Apx I in the CY-5 channel between 22.0 – 30.0
 If the positive control for Apx I has a Cq <22.0 or >30.0 the test is invalid for Apx I.
- Positive control will show a Cq value for the Apx III in the Texas Red channel between 22.0 – 30.0
 If the positive control for Apx III has a Cq <22.0 or >30.0 the test is invalid for Apx III.
- In the negative control well, signal for both Apx IV, Apx I and Apx III must be N/A or >38.0. If Apx IV, Apx I and/or Apx III is detected in the negative control well the plate results are invalid.
- In the negative control well the internal control should have a Cq value for the HEX channel between 26.0 – 34.0
 If the internal control has a Cq <26.0 or >34.0 in the negative control well, the plate results are invalid for both Apx and vtaA10.
- When a sample is negative for Apx IV, Apx I and Apx III and the internal control is out of range (see table below), the assay is invalid for this particular sample and should be repeated with a new DNA extract.
- If the sample is positive for Apx IV, Apx I and Apx III, the internal control is not considered (see table below).

Validation and interpretation of sample results:

Apx IV (FAM)	Apx I (CY-5)	Apx III (Texas Red)	IC (HEX)	Interpretation
Cq values	Cq values	Cq values	Cq values	
<38	<38	<38	YES* or N/A**	positive sample Apx IV, Apx I and Apx III
<38	<38	N/A** or >38	YES* or N/A**	positive sample Apx IV and Apx I
N/A** or >38	<38	<38	YES* or N/A**	positive sample Apx I and Apx III
<38	N/A** or >38	<38	YES* or N/A**	positive sample Apx IV and Apx III
<38	N/A** or >38	N/A** or >38	26-34	positive sample Apx IV
N/A** or >38	<38	N/A** or >38	26-34	positive sample Apx I
N/A** or >38	N/A** or >38	<38	26-34	positive sample Apx III
N/A**	N/A**	N/A**	26-34	negative sample
N/A**	N/A**	N/A**	N/A** or >34	invalid well

For final diagnosis qPCR results should be confirmed by alternative tests.

EC REP
 BioChek B.V.
 Fokkerstraat 14
 2811 ER Reeuwijk
 Netherlands
 tel: +31 182 582 592
 fax: +31 182 599 360
 E-mail: info@biochek.com
 Website: www.biochek.com


 BioChek (UK) Ltd.
 11 Mill farm business park
 Millfield Road, Hounslow
 London TW4 5PY
 United Kingdom

KI/CP101REV01

Symbol Glossary



Catalog number



Authorised representative in the European Community



Manufacturer



Date of manufacture



Expiry date



Batch number



Serial number



In vitro diagnostic



Consult instructions for use



Lower limit of temperature



Negative control



Positive control

3. Datapack *Actinobacillus pleuropneumoniae* DNA Test Kit

**Document:****Datapack Actinobacillus Pleuropneumoniae DNA Test Kit****Product Code SP104**

Contents

Summary

The kit
Key Performance Indicators
Applications

Datasheets

Sensitivity
Specificity
Lower Limit of Detection

Summary

The kit

- 100 reactions per kit
- Time required for qPCR (excluding DNA extraction) : 90 minutes
- Read at : FAM, Texas Red, CY5 and HEX
- qPCR
- sample material : Oral fluid, tissue samples, nasal swabs

Key performance features or indicators

Sensitivity > 99%

Specificity > 99%

Lower Limit Of Detection

Apx IV > 100 copies/reaction

Apx I > 100 copies/reaction

Apx III > 100 copies/reaction

Good results using different DNA extraction methods (spin column / silica based method)

Applications

- Detection of infected animals (porcine)
- Screening test for App free status

Data sheets

Specificity and Sensitivity

Procedure

To establish sensitivity monospecific culture samples (samples with known status from a certified lab) were used.

These samples were serotyped using MALDI-TOF and biochemical tests.

Results/Conclusion

Results monospecific samples, extraction method used: Silica based method

Table 1) Results monospecific samples

	Apx IV	Apx I	Apx III
Actinobacillus indolicus MN-134	0	0	0
Actinobacillus porcinus 27 KC 10	0	0	0
Actinobacillus porcinus SP 62	0	0	0
Actinobacillus minor CP 109 III SC 1 P 9	0	0	0
Actinobacillus indolicus 37 E 3	0	0	0
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 1	21,3	22,5	0
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 2	21,04	0	20,99
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 3	20,9	0	20,98
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 5a	21,15	22,27	0
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 5b	21,59	22,49	0
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 6	22,53	0	22,65
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 7	20,53	0	0
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 8	23,25	0	24,33
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 9	21,45	23,68	0
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 12	22,09	0	0
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 4	22,98	0	22,83
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 10	20,39	22,48	0
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 11	20,85	23,01	0
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 13	21,21	0	0
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 14	21,16	22,31	0
Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 15	21,89	0	22,06
Haemophilus Taxon C, CAMP 511 P 4	0	0	0
NAD-abh. Bacteria, B 20	0	0	0
NAD-abh. Bacteria, ME-4	0	0	0

Table 1: Results monospecific samples continued

	Apx IV	Apx I	Apx III
Haemophilus parasuis 84-17975, Serotype 13	0	0	0
Haemophilus parasuis 84-22113, Serotype 14	0	0	0
Haemophilus parasuis 84-15995, Serotype 15	0	0	0
Haemophilus Taxon C, CAMP 5113 P4	0	0	0
Haemophilus parasuis H465, Serotype 11	0	0	0
Haemophilus parasuis D74, Serotype 9	0	0	0
Haemophilus parasuis C5, Serotype 8	0	0	0
Haemophilus parasuis 174, Serotype 7	0	0	0
Haemophilus parasuis SW 140, Serotype 2	0	0	0
Haemophilus parasuis SW 114, Serotype 3	0	0	0
Haemophilus parasuis SW 124, Serotype 4	0	0	0
Haemophilus parasuis Nagasaki, Serotype 5	0	0	0
Haemophilus parasuis Strain Serotype 6	0	0	0
Haemophilus parasuis Strain Serotype 10	0	0	0
Haemophilus parasuis Strain Serotype 12	0	0	0
Haemophilus parasuis Serotype 1	0	0	0

No discrepancies, all serotypes react perfectly in the BioChek App DNA.

A second panel of monospecific culture samples was tested, extraction method used: Spin column kit

Table 2) Results monospecific samples

Samples taken from panel SA 0073

No	Name	FAM=Apx IV	Cy5=APX I	Texas = Apx III
1	Manheimia haemolytica	N/A	N/A	N/A
2	Actinobacillus pleuropneumonia	29,54	N/A	28,26
3	Enterobacter cloacae	N/A	N/A	N/A
4	Haemophilus parasuis	N/A	N/A	N/A
5	Pasteurella multocida DNT+	N/A	N/A	N/A
6	Staphylococcus aureus	N/A	N/A	N/A
7	Aspergillus niger	N/A	N/A	N/A
8	Candida albicans	N/A	N/A	N/A
9	Pseudomonas aeruginosa	N/A	N/A	N/A
10	Campylobacter jejuni	N/A	N/A	N/A
11	Campylobacter coli	N/A	N/A	N/A
12	Bacillus subtilis	N/A	N/A	N/A
13	Mycoplasma synoviae	N/A	N/A	N/A
14	Mycoplasma gallisepticum	N/A	N/A	N/A
15	Mycoplasma hyorhinis	N/A	N/A	N/A
16	Mycoplasma orale	N/A	N/A	N/A
17	Bordetella bronchiseptica	N/A	N/A	N/A
18	Pasteurella multocida DNT-	N/A	N/A	N/A
19	Mycoplasma avium spp paratbc	N/A	N/A	N/A
20	Staphylococcus haemolyticus	N/A	N/A	N/A

Table 2) continued

No	Name	FAM=Apx IV	Cy5=APX I	Texas = Apx III
21	<i>Aerococcus viridans</i>	N/A	N/A	N/A
22	<i>Serratia marcescens</i>	N/A	N/A	N/A
23	<i>Corynebacterium bovis</i>	N/A	N/A	N/A
24	<i>Streptococcus uberis</i>	N/A	N/A	N/A
25	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	N/A	N/A	N/A
26	<i>Streptococcus agalactiae</i>	N/A	N/A	N/A
27	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	N/A	N/A	N/A
28	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	N/A	N/A	N/A
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>pneumoniae</i>	N/A	N/A	N/A
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>ozaenae</i>	N/A	N/A	N/A
31	<i>Mycoplasma bovis</i>	N/A	N/A	N/A
32	<i>Salmonella typhimurium</i>	N/A	N/A	N/A
33	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	N/A	N/A	N/A
34	<i>Erwinia persicina</i>	N/A	N/A	N/A
35	<i>Lactococcus lactis</i>	N/A	N/A	N/A
36	<i>Aeromonas bestiarum</i>	N/A	N/A	N/A
37	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	N/A	N/A	N/A
38	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	N/A	N/A	N/A
39	<i>Mycoplasma flocculare</i>	N/A	N/A	N/A
40	<i>Pasteurella multocida</i>	N/A	N/A	N/A
41	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	N/A	N/A	N/A
42	<i>Brachyspira pilosicoli</i>	N/A	N/A	N/A
43	<i>Brachyspira intermedia</i>	N/A	N/A	N/A
44	<i>Enterococcus faecalis</i>	N/A	N/A	N/A
45	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	N/A	N/A	N/A
46	<i>Escherichia coli</i>	N/A	N/A	N/A
47	<i>Streptococcus suis</i> serotype 1	N/A	N/A	N/A
48	<i>Streptococcus suis</i> serotype 2	N/A	N/A	N/A
49	<i>Streptococcus suis</i> serotype 7	N/A	N/A	N/A
50	<i>Streptococcus suis</i> serotype 9	N/A	N/A	N/A
51	<i>Clostridium sporogenes</i>	N/A	N/A	N/A
78	PRRSV type 1	N/A	N/A	N/A
79	PRRSV type 1	N/A	N/A	N/A
96	PRRSV type 2	N/A	N/A	N/A
97	PRRSV type 2	N/A	N/A	N/A

No discrepancies

Table 3: Sensitivity and specificity for BioChek App qPCR targets, for interpretation of serotypes see insert.

target	Sensitivity	Specificity
Apx IV	100%	100%
Apx I	100%	100%
Apx III	100%	100%

Field samples were evaluated using the BioChek App qPCR test kit.

Sample types tested were: oral fluid / lung tissue

NA extraction methods were: Silica based method

Tissue samples were pretreated before extraction using the following protocol:

- Small piece of tissue was cut off and cut into small pieces.
- Small pieces of tissue were transferred to a vial.
- A pestle was used to further grind the tissue
- PBS and proteinase K were added and left to incubate at 56°C until the tissue was dissolved
- 200 µl of the dissolved tissue was used for the silica based extraction method.

This method resulted in little to no inhibition

Oral fluids were used for PCR using the following protocol:

- Oral fluid samples were centrifuged for a few seconds to remove most of the debris.
- 200 µl of the supernatant was used for the silica based extraction method.

This method resulted in little to no inhibition

Lower Limit of Detection (LLOD)

Procedure

To establish sensitivity plasmid dilutions were used. The dilutions were tested in multiple runs on different dates.

Results/Conclusion

Table 4: BioChek Apx IV sensitivity testing, plasmid dilutions (no DNA extraction used)

Apx IV	run 1 Cq	run 2 Cq	run 3 Cq	run 4 Cq
100 copies/reaction	35,18	36,17	35,6	33,84
50 copies/reaction	0,00	0,00	39,66	38,79
25 copies/reaction	0,00	0,00	0	0
12 copies/reaction	0,00	0,00	0	0

Table 5: BioChek Apx I sensitivity testing, plasmid dilutions (no DNA extraction used)

Apx I	run 1 Cq	run 2 Cq	run 3 Cq	run 4 Cq
100 copies/reaction	34,90	36,57	34,9	36,57
50 copies/reaction	38,34	38,97	38,34	38,97
25 copies/reaction	0,00	0,00	0	0
12 copies/reaction	0,00	0,00	0	0

Table 6: BioChek Apx III sensitivity testing, plasmid dilutions (no DNA extraction used)

Apx III	run 1 Cq	run 2 Cq	run 3 Cq	run 4 Cq
100 copies/reaction	34,87	35,10	33,64	36,19
50 copies/reaction	37,18	35,05	37,76	36,9
25 copies/reaction	37,79	0,00	39,91	0
12 copies/reaction	0,00	37,38	0	39,23

Apx IV

100 copies/reaction is the lowest load detected repeatedly, 4 out of 4 times

50 copies/reaction detected, 2 out of 4 times

25 copies/reaction detected, 0 out of 4 times

12 copies/reaction detected, 0 out of 4 times

Apx I

100 copies/reaction, is the lowest load detected repeatedly, 4 out of 4 times

50 copies/reaction, detected 4 out of 4 times but Cq > 38

25 copies/reaction, detected 0 out of 4 times

12 copies/reaction, detected 0 out of 4 times

Apx III

100 copies/reaction, detected 4 out of 4 times

50 copies/reaction, is the lowest load detected repeatedly, 4 out of 4 times

25 copies/reaction, detected 2 out of 4 times

12 copies/reaction, detected 2 out of 4 times

With field samples the nucleic acid extraction method used can be of influence for the sensitivity of the assay.

1. Conclusions

BioChek App qPCR test kit conclusions:

- Specificity > 99% for all targets
- Sensitivity > 99% for all targets
- LLOD for Apx IV > 100 copies/reaction
LLOD for Apx I > 100 copies/reaction
LLOD for Apx III > 50 copies/reaction
- Field samples performed well using different sample types, the extraction method needs to be suitable for the matrix. Pretreatment for tissue samples seems necessary.

XII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Mathias Ritzmann für die Überlassung dieses interessanten und aktuellen Themas als auch für die Möglichkeit, diese Arbeit als „Externer Doktorand“ durchführen zu dürfen.

Des Weiteren bedanke ich mich im besonderen Maße bei meinem Betreuer PD Dr. Matthias Eddicks für all seine konstruktiven und inspirativen Ideen sowie unsere amüsanten Gespräche.

Daneben gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Schweineklinik in München, die mir bei Fragestellungen sowie am Schlachthof zur Seite standen.

Der Firma MSD Tiergesundheit danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel. Außerdem bedanke ich mich sehr herzlich bei Dr. Kerstin Fiebig für die Hilfe bei der Entwicklung des Studiendesigns und dessen Durchführung. Ebenfalls gilt mein Dank Dr. Robert Tabeling und Dr. Jasmin Mischok für die Unterstützung beim Schlachtlungencheck.

Dem Intervet-International-Team in Boxmeer in den Niederlanden danke ich sehr für die Bearbeitung und Auswertung der Proben, die für das Gelingen dieser Arbeit elementar waren. Namentlich möchte ich mich bei Hanni Swam, Irmgard Dohmen und Annelies Duivelshof- Crienlen bedanken.

Allen involvierten Landwirten im besonderen Simon, Johannes, Wilhelm, Stefan, Wilfried und Fabian danke ich sehr herzlich für das geschenkte Vertrauen. Mir standen stets Tür und Tor offen und ohne eure Unterstützung wäre diese Studie nicht möglich gewesen. Außerdem danke ich allen Schlachthofmitarbeitern, die es ermöglicht haben, am Schlachtband Stichblutproben zu gewinnen und Lungen-Scorings durchführen zu können.

Der Tierarztpraxis am Kapellhof gilt mein Dank für die Hilfe bei der Suche der Versuchsbetriebe, der Unterstützung am Schlachthof mit „Man-Power“ als auch bei der Flexibilität in meiner Freizeitgestaltung, sodass es möglich war, diese Arbeit zu vollenden. Für die Hilfe möchte ich mich im besonderen Maße bei Corinna, Theresa, Julia und Kathrin bedanken.

Des Weiteren gilt mein aufrichtiger Dank Julia für die stetige Unterstützung. Ebenfalls möchte ich mich bei Phillip und Nantke für ihre Hilfe bedanken.

Meinen Eltern sowie meinen Brüdern Stefan und Roman gilt ein ganz herzlicher Dank für die ermutigenden und aufmunternden Worte und die Unterstützung im Laufe der Jahre. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt! Daneben bedanke ich mich besonders bei meinem Onkel Hermann für seine Hilfe.

Danke Sophia, dass du mir stets aufmunternd und helfend zur Seite gestanden hast und dass du in dieser recht stressigen Zeit so geduldig warst.